

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

RAQUEL FRAGOSO PEREIRA

**IMPLANTAÇÃO DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS NO LABORATÓRIO
DE IMUNOFARMACOLOGIA / UFPB: ASPECTOS MORFOLÓGICOS
DE DESORDENS RESPIRATÓRIAS EXPERIMENTAIS**

João Pessoa - PB
2017

RAQUEL FRAGOSO PEREIRA

**IMPLANTAÇÃO DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS NO LABORATÓRIO
DE IMUNOFARMACOLOGIA / UFPB: ASPECTOS MORFOLÓGICOS
DE DESORDENS RESPIRATÓRIAS EXPERIMENTAIS**

Monografia a ser apresentada à coordenação do curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do grau de bacharel em farmácia.

João Pessoa, 30 de Maio de 2017.

Orientadora: Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira.

João Pessoa - PB
2017

P436i Pereira, Raquel Fragoso.

Implantação de técnicas histológicas no laboratório de imunofarmacologia /
UFPB: aspectos morfológicos de desordens respiratórias experimentais / Raquel
Fragoso Pereira. - - João Pessoa: [s.n.], 2017.

88f.

Orientadora: Giciane Carvalho Vieira.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Técnicas histológicas. 2. Doenças alérgicas. 3. Análise tecidual

BS/CCS/UFPB

CDU: 57.086(043.2)

RAQUEL FRAGOSO PEREIRA

**IMPLANTAÇÃO DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS NO LABORATÓRIO
DE IMUNOFARMACOLOGIA / UFPB: ASPECTOS MORFOLÓGICOS
DE DESORDENS RESPIRATÓRIAS EXPERIMENTAIS**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam

(Departamento de Fisiologia e Patologia - UFPB)

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras

(Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPB)

Profa. Dra. Caliandra Maria Luna Lima

(Departamento de Fisiologia e Patologia - UFPB)

Orientadora: Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira

(Departamento de Morfologia - UFPB)

*Aos meus pais, fonte de companheirismo e incentivadores em essência,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, minha gratidão é dada ao Autor e Consumador da minha fé que de forma onipresente me mostra o seu infinito amor e me inspira a continuar caminhando, obrigada Deus.

Aos meus pais, **Maria Auxiliadora Fragoso Pereira** e **Edson Pereira da Silva** pelo amor, exemplo e dedicação constante ao nosso lar. A minhas irmãs, **Sara Fragoso Pereira** e **Sinara Pereira Fragoso** as quais tenho como modelo em todas as áreas da vida, hoje, com seus esposos, **Luciano Jr.** e **Bruno Costa**, e sempre, demonstram amor e cuidado, ambos fundamentais para o meu crescimento. A mais nova integrante da família, nossa princesa **Rebeca**, obrigada por nos lembrar da essência da vida ao contemplarmos o seu rosto.

Aos meus familiares, **Alexandro** e **Socorro Fragoso** que de forma tão próxima me mostram como prosseguir me ensinando o que já lhes foi ensinado. Aos meus primos **João Vitor Fragoso** e **Filipe Fragoso** pela companhia e inesgotável alegria a mim concedida. A minha dádiva, amigo e namorado **Antônio Raphael Cavalcanti** pelo amor do Alto doado, pelos conselhos, aprendizados e, principalmente, por ser o símbolo de segurança que encontrei. Você é parte essencial desta conquista.

Deixo eternizada minha gratidão a **Giciane Carvalho Vieira**, minha orientadora, que sempre foi um exemplo importante e fonte de inspiração para a minha formação. Muito obrigada por todo o estímulo, paciência, orientação científica e de vida, e, principalmente, por confiar na minha competência na realização deste trabalho. A conquista é nossa.

Muito obrigada a **Márcia Regina Piuvezam**, pela co-orientação acadêmica, indiscutível amizade, compreensão, paciência e mais paciência. Obrigada por nos receber fisicamente possibilitando a realização dos experimentos e compartilhar novas descobertas. És um exemplo de dedicação e ética.

Aos membros da banca examinadora, **Márcia Regina Piuvezam**, **Robson Cavalcante Veras** e **Caliandra Luna** incentivadores na busca pelo conhecimento. Obrigada por aceitar fazer parte e contribuir para o enriquecimento deste trabalho. Vocês são verdadeiros exemplos de mestre no corpo docente do curso.

Aos outros professores do laboratório de imunofarmacologia **Sandra Mascarenhas e Cláudio Santos**, obrigada por estarem presente e contribuírem no que foi preciso.

A minha família científica, amigos e companheiros de experimento que contribuíram para este momento: **Fagner, Luiz, Laércia, Tamires, Larissa, Talissa, José Guilherme, Fernanda, Grasiella, Larissa R., Carol, Bianka, Éssia, Deyse, Ícaro, Juliana, Júlia, José Marreiro, Anne** e, sobretudo a **Allysson**, verdadeiro amigo que se doou junto comigo na realização deste trabalho, companheiro fiel em todos os momentos que uma graduação/ iniciação científica podem ter.

A **José Crispim Duarte**, por sua dedicação ao biotério, por sua paciência, e disponibilidade em ajudar, sempre que preciso. A **Mônica**, que ao longo desse trabalho foi mais do que uma funcionária, uma dose diária de muita simpatia, humildade, humor e amizade no nosso laboratório.

Aos professores do curso de farmácia, especialmente, **Elisana Afonso de Moura, Robson Cavalcante Veras, Pablo Queiroz Lopes, Bagnólia Araújo Costa, Isabelle Gomes Santos, Fábio Santos, Caliandra Luna e Danielle Idalino Janebro**, por suavizar nossa caminhada no curso e nos ensinar seja verbalmente ou não como sermos profissionais de referência e diferenciados onde quer que estejamos.

A minha querida turma de graduação em especial a **Giuliana Amanda, Danielly Araújo, Lisandra Francilino, Francisco Allysson e Deivid Marques**, “meus friends”, companheiros diários de alegria, mas também de situações difíceis.

À Coordenação do curso de Farmácia, na pessoa da profa **Rossana Souto Maior**, pela proatividade e interesse em solucionar problemas sempre que expostos, além do fantástico exemplo de docente no curso que és. Ao Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES/CNPq) pelo apoio financeiro e suporte técnico; Ao **laboratório de Imunofarmacologia** e a **Universidade Federal da Paraíba (UFPB)** por possibilitar a infraestrutura necessária para a realização desta pesquisa,

Agradeço.

*"Somente um principiante que nada sabe sobre ciência diria que a ciência prejudica a fé.
Se você realmente estudar a ciência, ela o levará para mais perto de Deus".*

Candace Adams

RESUMO

A técnica histológica é um conjunto de procedimentos que consiste na preparação de amostras teciduais para análise sob microscopia de elementos normais ou patológicos. Trabalhos pré-clínicos desenvolvidos anteriormente no laboratório de imunofarmacologia da UFPB demonstraram a necessidade da implantação da técnica histológica para estudos morfológicos em modelos de desordens respiratórias. Doenças respiratórias, como por exemplo, as doenças alérgicas e a lesão pulmonar aguda, são tidas como um problema mundial de saúde resultante de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais. Doenças alérgicas são caracterizadas pelo aumento da produção de muco, inflamação eosinofílica, hiper-responsividade brônquica, e, em caso mais graves, remodelamento de tecidos. Já a lesão pulmonar aguda se diferencia pelo acometimento da região alveolar envolvendo a participação de células epiteliais e endoteliais, o influxo de células inflamatórias, a interrupção da produção do surfactante e edema pulmonar. As colorações histológicas são úteis na observação desses parâmetros, por exemplo, a Hematoxilina eosina (H&E) demonstra parâmetros inespecíficos como infiltração e edema, o Ácido Periódico de Schiff (PAS) revela as células caliciformes produtoras de muco, o Azul de Toluidina (AT) ressaltam mastócitos metacromáticos e o Tricoma de Gomori (TG) evidencia as fibras colágenas. O objetivo desse trabalho foi implantar as técnicas histológicas para avaliar e diferenciar em termos morfológicos os modelos de desordens respiratórias desenvolvidos no laboratório de imunofarmacologia. No modelo de doenças alérgicas das vias aéreas, foram utilizados camundongos BALB / c fisiológicos (Basal), sensibilizados e desafiados com OVA (OVA) ou tratados com budesonida (BUD). No modelo de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) os camundongos foram desafiados com LPS (LPS) ou tratados com dexametasona (DEXA). No último dia de cada protocolo os animais foram eutanasiados e foram coletados o lavado do fluido nasal (NALF), o Lavado broncoalveolar (BAL), o pulmão e a cavidade nasal. A análise estatística foi feita pelo (ANOVA) *one-way* utilizando o GraphPad Prism® versão 5.01. Para análise estatística dos escores foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* em conjunto com análise de *Image J*. No modelo de doenças alérgicas das vias aéreas, o grupo OVA apresentou aumento significativo ($p < 0,001$) da quantidade de células no NALF ($0,27 \pm 0,02$) e no BAL ($8,20 \pm 0,08$) quando comparado ao grupo basal ($0,08 \pm 0,01$) ($1,00 \pm 0,15$). O infiltrado foi do tipo eosinofílico ($0,15 \pm 0,015$) ($3,18 \pm 0,53$). A análise histológica da cavidade nasal do grupo OVA apresentou pela coloração H&E, infiltrado de células ($3,40 \pm 0,31$), pelo PAS, hipertrofia e hiperplasia das células produtoras de muco ($3,60 \pm 0,24$), pelo AT, aumento do número de mastócitos ($3,20 \pm 0,37$) e pelo TG, sutil remodelamento tecidual ($2,40 \pm 0,40$). No tecido pulmonar, houve um aumento do infiltrado celular ($3,80 \pm 0,20$) e da quantidade de muco ($3,60 \pm 0,24$) no grupo OVA. A budesonida reduziu esses parâmetros avaliados. No modelo de LPA, o grupo LPS apresentou aumento de células totais ($7,30 \pm 0,26$) e neutrófilos ($5,48 \pm 0,41$) em comparação ao grupo basal ($0,32 \pm 0,10$) ($0,09 \pm 0,02$). A análise histológica demonstrou, pela H&E, inflamação intersticial ($3,60 \pm 0,24$), edema pulmonar ($3,20 \pm 0,37$), hemorragia ($3,00 \pm 0,31$) e pelo TG, aumento de fibras colágenas ($2,40 \pm 0,24$) no grupo LPS em relação ao grupo basal. Com a implantação de técnicas histológicas, foi possível observar e fundamentar a participação de componentes teciduais como células, matriz extracelular e mediadores em modelos de doenças respiratórias contribuindo com os trabalhos pré-clínicos desenvolvidos no laboratório de Imunofarmacologia.

Palavras chave: Processamento histológico, análise tecidual, doenças alérgicas, lesão pulmonar aguda.

ABSTRACT

The histological technique is a set of procedures based on the preparation of samples for analysis under microscopy of normal or pathological elements. Pre clinical work developed at the immunopharmacology laboratory of the UFPB, demonstrated the need for implantation of the histological technique for morphological studies in models of respiratory disorders. Respiratory diseases such as allergic diseases and acute lung injury are seen as a global health problem resulting from a complex interaction between genetic and environmental factors. Allergic diseases are characterized by increased mucus production, eosinophilic inflammation, bronchial hyperresponsiveness and if more severe tissue remodeling. On the other hand acute lung injury is affected by involvement of the alveolar region involving epithelial and endothelial cell, influx of inflammatory cells, discontinuation of surfactant production and pulmonary edema. Histological staining is useful in observing these parameters for example Hematoxylin eosin (H & E) demonstrates non specific parameters such as infiltration and edema, Schiff's Periodic Acid (PAS) reveals goblet cells producing mucus, Toluidine Blue (AT) emphasizes metachromatic mast cells and the Gomori Tricoma (TG) shows the collagen fibers. The purpose of this work was to implant the histological techniques to evaluate and differentiate in morphological terms the respiratory disorder models developed in the immunopharmacology laboratory. In the model of allergic diseases of the airways, physiological BALB / c mice (Basal), sensitized and challenged with OVA (OVA) or treated with budesonide (BUD) were used. In the model of Acute Lung Injury (LPA) the mice were challenged with LPS (LPS) or treated with dexamethasone (DEXA). On the last day of the whole protocol of animals with euthanasia and were collected the nasal fluid lavage (NALF), bronchoalveolar lavage (BAL), lung and nasal cavity. A statistical analysis was done by (ANOVA) one-way using GraphPad Prism® version 5.01. In the model of airway allergic diseases, the OVA group shows a significant increase ($p < 0.001$) in the amount of NALF cells ($0, 27 \pm 0.02$) and BAL cells (8.20 ± 0.08) when compared to the basal group (0.08 ± 0.01) (1.00 ± 0.15). The infiltrate was of the eosinophilic type (0.15 ± 0.015) (3.18 ± 0.53). A histological analysis of the nasal cavity of the OVA group showed H & E staining, cell infiltration (3.40 ± 0.31), by PAS, hypertrophy and hyperplasia of mucus producing cells (3.60 ± 0.24), by AT, increased mast cells (3.20 ± 0.37) and TG, subtle tissue remodeling (2.40 ± 0.40). In lung tissue, were increased cellular infiltration (3.80 ± 0.20) and the amount of mucus (3.60 ± 0.24) in the OVA group increased. Budesonide decreased these parameters. On LPA model, the LPS group showed increase of total cells (7.30 ± 0.26) and neutrophils (5.48 ± 0.41) compared to the basal group (0.32 ± 0.10) ($0, 09 \pm 0.02$). A histological analysis showed H & E interstitial inflammation (3.60 ± 0.24), pulmonary edema (3.20 ± 0.37), hemorrhage (3.00 ± 0.31) and by TG, Collagen fibers (2.40 ± 0.24) in the LPS group compared to the basal group. With the implementation of histological techniques, it was possible to observe the participation of tissue components such as cells, extracellular matrix and mediators in respiratory disease models contributing to the pré clinical work developed in the immunopharmacology laboratory.

Keywords: Histological processing, tissue analysis, allergic diseases, acute lung injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processamento histológico manual. Etapa: 1-coleta; 2-fixação; 3-desidratação; 4-clarificação; 5- impregnação; 6- emblocagem; 7-microtomia; 8-distensão e pescaria 9- Coloração	25
Figura 2. Micrótomo utilizado para secção dos cortes. Equipamento e suas partes.....	27
Figura 3. Mecanismo da associação dos corantes com os componentes teciduais.....	28
Figura 4. Vias respiratórias e suas regiões. Porção condutora: cavidade nasal, nasofaringe, orofaringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos. Porção respiratória: bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos.....	31
Figura 5. Cavidade nasal dividida em três regiões: o vestíbulo nasal, a região respiratória e a região olfatória.....	32
Figura 6. Na fase aguda da síndrome (lado direito), é ilustrado o desprendimento de ambas as células epiteliais brônquicas e alveolares, com a formação de membranas hialinas, ricas em proteínas, na membrana basal alterada. Os neutrófilos são mostrados aderindo ao endotélio capilar lesionado e atravessando o interstício para o espaço aéreo, que está preenchido com fluido de edema rico em proteínas. No espaço aéreo, macrófago alveolar secreta citocinas (IL-1, 6, 8 e 10) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) os quais atuam localmente para estimulam a quimiotaxia e ativar neutrófilos. Neutrófilos podem liberar oxidantes, proteases, leucotrienos, e outras moléculas pró-inflamatórias, tais como fator de ativação plaquetária (PAF).....	36
Figura 7. Esquema representativo do modelo experimental de Síndrome Alérgica de Rinite e Asma Combinadas (CARAS)	48
Figura 8. Esquema do protocolo de LPA em modelo animal.....	49
Figura 9. Processamento histológico – etapa de desidratação.....	51
Figura 10. Processamento histológico – etapa de diafanização.....	52

Figura 11. Processamento histológico – etapa de microtomia, pesca e secagem....53

Figura 12. Fotomicrografias representativas da padronização da coloração Hematoxilina - eosina (H&E) em cortes de pulmão de camundongos BALB / c: diferença de tonalidade conforme a variação dos tempos de imersão. (A) Tempos equivalentes na hematoxilina e eosina (B) Acréscimo do ácido acético ao corante eosina. (C) Coloração H&E padronizada. Lâminas observadas em objetiva de 10x, A.T. 100x, 600 µm.....62

Figura 13. Fotomicrografias representativas da padronização da coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) em cortes das vias aéreas de camundongos BALB / c: diferença da coloração antes (A) e depois (B) dos ajustes. Lâminas observadas em objetiva de 40x, A.T. 400x, 150 µm.....63

Figura 14. Fotomicrografias representativas da padronização da coloração Azul de Toluidina (AT) em cortes da cavidade nasal de camundongos BALB / c: diferença da coloração antes (A) e depois (B) dos ajustes. Lâminas observadas em objetiva de 40x, A.T. 400x, 150 µm.....64

Figura 15. Fotomicrografias representativas da padronização da coloração Tricrômica de Gomori (TG) em cortes da cavidade nasal de camundongos BALB / c: diferença da coloração antes (A) e depois (B) dos ajustes. . Lâminas observadas em objetiva de 10x, A.T. 100x, 600 µm ou 40x, A.T. 400x, 150 µm.....64

Figura 16. . Fotomicrografias representativas da cavidade nasal de camundongos. Grupo Basal, OVA e BUD. Coradas por Hematoxilina Eosina (H&E), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Azul de Toluidina (AT) e Tricromo de Gomori (TG) A.T 100x (600 µm) e 400x (150 µm). ▲ = infiltração perivascular, * = células caliciformes produtoras de muco, ↘ mastócitos epiteliais, ● = fibras colágenas.....66

Figura 17. Histogramas da quantidade de *pixels* mensurados nas lâminas da cavidade nasal de camundongos BALB / c com doença alérgica das vias aéreas, do

grupo Basal, OVA e BUD. Coradas em H&E, A.T 400x (150 µm). Área mensurada 300x240 *pixels*; RGB; 21k.....67

Figura 18. Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos. Grupo Basal, OVA e BUD. Coradas por Hematoxilina Eosina (H&E), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Azul de Toluidina (AT) e Tricromo de Gomori (TG) A.T 100x (600 µm) e 400x (150 µm). ▲ = infiltração perivascular, * = células caliciformes produtoras de muco, ↘ mastócitos epiteliais, ● = fibras colágenas.....69

Figura 19. Histogramas da quantidade de *pixels* mensurados no tecido pulmonar de camundongos BALB / c com doença alérgica das vias aéreas, do grupo Basal, OVA e BUD. Coradas em H&E, A.T 400x (150 µm). Área mensurada 300x240 *pixels*; RGB; 21k.....70

Figura 20. Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos. com LPA . Grupo Basal, LPS e DEXA. Coradas por Hematoxilina Eosina (H&E) e Tricromo de Gomori (TG). A.T 100x (600 µm) e 400x (150 µm). ▲ = infiltração perivascular, ↓ = edema, ↓ = hemorragia, ● = fibras colágenas.....72

Figura 21. Histogramas de quantificação da quantidade de *pixels* mensurados nas lâminas da cavidade pulmonar de camundongos com LPA, conforme o grupo basal, LPS e DEXA (horizontal). Coradas em H&E, A.T 400x (150 µm). Área mensurada 300x240 *pixels*; RGB; 21k.....73

Figura 22. Esquema das etapas do processamento histológico implantado seguido dos parâmetros analisados nos modelos de desordens respiratórias conforme a coloração utilizada. As caixas amarelas sugerem a comprovação dos parâmetros analisados no presente trabalho.....81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções fixadoras, seu método e composição.....	22
Tabela 2. Equivalentes lineares de conversão.....	26
Tabela 3. Exemplos de corantes ácidos e básicos.....	29
Tabela 4. Divisão dos grupos experimentais.....	40
Tabela 5. Solução salina.....	41
Tabela 6. Solução anestésica.....	42
Tabela 7. Solução descalcificadora EDTA em tampão fosfato 0,1 M.....	42
Tabela 8. Composição da formalina tamponada.....	43
Tabela 9. Composição da hematoxilina de Harris.....	43
Tabela 10. Composição da Eosina Y ou amarelada.....	44
Tabela 11. Composição da mistura Tricrômica de Gomori.....	44
Tabela 12. Composição do azul de toluidina.....	45
Tabela 13. Composição do ácido periódico a 1%	45
Tabela 14. Composição do Reativo de Schiff.....	45
Tabela 15. Composição do banho sulfuroso.....	46
Tabela 16. Parâmetros analisados no do escore histológico.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Perfil da migração celular para o NALF após desafio alergênico com OVA em camundongos BALB / c sensibilizados com OVA.....	58
Gráfico 2. Perfil de migração celular no BAL de camundongos BALB / c sensibilizados e desafiados com OVA em modelo experimental de CARAS.....	59
Gráfico 3. Correlação do modelo LPA com o número de células totais e diferenciais no BAL.....	60
Gráfico 4. Escore qualitativo das alterações morfológicas na cavidade nasal dos animais com doenças alérgicas das vias aéreas.....	67
Gráfico 5. Escore qualitativo das alterações morfológicas na cavidade pulmonar dos animais com doenças alérgicas das vias aéreas.....	70
Gráfico 6. Escore qualitativo das alterações morfológicas no tecido pulmonar dos animais com LPA.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
A.T	Aumento Total
AHR	hiper-responsividade das vias aéreas
AT	Azul de Toluidina
BAL	Lavado Broncoalveolar
BUD	Budesonida
C- kit	Proteína Tirosina kinase
CARAS	Síndrome Alérgica de Rinite e Asma Combinadas
CD 52	Grupo de diferenciação 52
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTH	Células Tronco Hematopoéticas
CXCL5	Quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-5
DEXA	Dexamentasona
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DRC	Doenças Respiratórias Crônicas
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ETS	Fator de Transcrição do Epitélio
Foxa 2	Gene Forkhead Box A2
H&E	Hematoxilina & Eosina
H1	Receptor de Histamina 1
H2	Receptor de Histamina 2
H3	Receptor de Histamina 3
H4	Receptor de Histamina 4

HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HPV	Papiloma Vírus Humano
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
IgE	Imunoglobulina E
IL- 5	Interleucina - 5
IL-10	Interleucina -10
IL-12	Interleucina -12
IL-13	Interleucina - 13
IL-1β	Interleucina 1 - beta
IL-2	Interleucina - 2
IL-4	Interleucina - 4
IM	Intramuscular
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
KC	Queratinócitos
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
MBP	Proteína Básica Principal (<i>Major Basic Protein</i>)
mm	Milímetro
NALF	Fluido do Lavado Nasal
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Solução de Tampão fosfato
PLC	Fosfolipase C

pm	Picômetro
SCF	Fator de Célula Tronco
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SNED	Sistema Neuroendócrino Difuso
TG	Tricrômico de Gomori
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
T_H2	T <i>helper</i> 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - alfa
TTF1	Fator de Transcrição da Tireóide -1
STAT 6	Tradutor de sinal e ativador da transcrição 6
MUC5AC	Mucina 5 Ac
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1. Coleta	21
2.2 Fixação	21
2.3 Descalcificação	23
2.4 Processamento histológico	24
2.5 Microtomia	27
2.6 Coloração	28
2.7 Desordens respiratórias: abordagem morfológica	30
2.7.1 Sistema respiratório	30
2.7.2 Doenças alérgicas das vias aéreas	33
2.7.3 Lesão pulmonar aguda	35
2.8 Problemática	37
2. OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3. METODOLOGIA	39
3.1. Animais	39
3.2 Substâncias e sais	40
3.3 Soluções	41
3.4 Equipamentos	47
3.5 Modelos experimentais de desordens respiratórias	47
3.5.1 Modelo de Síndrome Alérgica de Rinite e Asma Combinadas (CARAS)	47
3.5.2 Modelo de Lesão Pulmonar Aguda (LPA)	48
3.6 Coleta dos fluidos do lavado nasal e bronco alveolar para contagem celular	49
3.6.1 Coleta dos órgãos para técnica histológica	50
3.6.2 Técnica histológica – Processamento	51
3.6.3 Coloração Hematoxilina Eosina (H&E)	53
3.6.4 Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS)	54
3.6.5 Coloração Azul de Toluidina (AT)	55
3.6.7 Coloração Tricrômico de Gomori (TG)	55
3.7 Fotomicrografias	56
3.8 Análise estatística	56

4. RESULTADOS	58
4.1 Perfil de migração celular para o Lavado do Fluido Nasal (NALF) após desafio alergênico de camundongos BALB / c sensibilizados com ovalbumina (OVA)	58
4.2 Perfil de migração celular para o Lavado Broncoalveolar (BAL) em camundongos BALB / c sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) em modelo experimental de Síndrome Alérgica de Rinite e Asma Combinadas (CARAS).....	59
4.3 Coloração Hematoxilina Eosina (H&E) em cortes histológicos de pulmão.....	61
4.4. Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) em cortes da cavidade nasal	62
4.5 Coloração Azul de Toluidina (AT) em cortes da cavidade nasal	63
4.6 Coloração Tricrômica de Gomori (TG) em cortes da cavidade nasal	64
4.9 Análise histológica do pulmão de camundongos após protocolo experimental de Lesão Pulmonar Aguda (LPA).....	71
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS	88
Certidão do CEUA.....	88

1. INTRODUÇÃO

A histologia é a ciência que estuda as células no contexto da estrutura tecidual e a inter-relação com os constituintes da matriz extracelular (ROSS; PAWLINA, 2012). O procedimento mais utilizado para avaliação tecidual é a preparação dos cortes histológicos por meio de um processamento técnico. A técnica histológica ou histotecnologia foi criada a fim de se observar estruturas teciduais que antes eram espessas e sem contrastes, tornando-as delgadas e contrastadas. Com isso, a histotecnologia é definida como o conjunto de procedimentos que envolve a preparação de amostras teciduais para análise sob microscopia (MOLINARO et al., 2010).

O estudo das células e dos elementos da matriz extracelular por meio das técnicas histológicas proporciona a análise dos elementos teciduais normais ou patológicos. Desta maneira, é possível estudar essas estruturas por longos períodos em diversas condições fisiológicas ou experimentais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As técnicas histológicas têm importância no ambiente hospitalar, na área clínica, além de possibilitar a obtenção do diagnóstico a partir do exame histopatológico. Esse exame consiste na análise macroscópica e microscópica dos tecidos para a detecção de possíveis alterações existentes, com a finalidade de informar a natureza, a gravidade, a extensão, a evolução e a intensidade dessas alterações, além de sugerir ou até mesmo confirmar a causa da afecção (YOUNG, 2007).

Essas técnicas são amplamente utilizadas no diagnóstico de doenças cérvico vaginais (CASTRO et al., 2009), doenças glomerulares (CARDOSO; KIRSZTAJN, 2006), doenças pulmonares (NAKAYAMA et al., 2017) e diversos tipos de desordens proliferativas (LEE et al., 2017) (MATZ et al., 2016). Em comparação com os exames de imagens, como a ultrassonografia e a ressonância magnética, o exame histopatológico é o de eleição para a identificação das características de uma neoplasia, pois permite classificar a doença quanto ao grau, presença de necrose, invasão linfática e vascular (QUEIROZ et al., 2013). Ou seja, permite uma análise da arquitetura e dos padrões de crescimento da neoplasia (invasividade). Desta forma, proporciona o diagnóstico conclusivo na maioria dos casos (BIALECKI et al., 2006).

Em relação ao sistema respiratório, embora a biópsia de tecidos seja considerada altamente invasiva e requeira um alto nível de perícia, ela torna-se um exame útil para definir a dimensão da inflamação das vias aéreas (WADSWORTH; DORSCHIED, 2011).

Em termos de ensino superior, vários cursos de graduação na área da saúde oferecem a disciplina histologia em sua grade, entretanto, um problema enfrentado pelos estudantes e pesquisadores desta área é entender a natureza bidimensional da imagem tecidual (ROSS; PAWLINA, 2012). A implantação de técnicas histológicas no laboratório de pesquisa que recebe estudantes da graduação, não só contribui para o aperfeiçoamento do aprendizado dessa ciência, mas também oferece ensino diferencial técnico e científico sobre esse assunto.

Na pesquisa pré-clínica, a técnica histológica e a análise tecidual são consideradas ferramentas úteis para confirmação de alguns modelos experimentais, bem como, assegurar o efeito de uma determinada substância em teste ou, até mesmo, compará-la com outra já comercializada.

Neste sentido, uma importante contribuição tem sido dada ao se estudar os parâmetros histológicos, sejam eles normais ou patológicos. Portanto, a implantação de técnicas histológicas no laboratório de imunofarmacologia no IPeFarM/ UFPB/ João Pessoa, visou proporcionar um maior conhecimento morfológico dos modelos de doenças alérgicas das vias aéreas e de lesão pulmonar aguda demonstrando a fundamentação do modelo experimental bem como o efeito terapêutico local de substâncias antes de serem utilizadas como medicamentos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Para que a análise histológica seja possível, o tecido deverá ser submetido a procedimentos técnicos que preservem sua estrutura original. Os procedimentos utilizados para se obter amostras de tecido ou preparos histológicos retirados de um organismo para exame microscópico incluem: coleta, fixação, desidratação, clarificação, impregnação, inclusão, microtomia, coloração e montagem. No caso de tecidos calcificados, há o acréscimo da etapa de descalcificação após a fixação e, em seguida, a realização dos outros procedimentos (MOLINARO et al., 2010).

2.1. Coleta

Uma preparação histológica ideal se inicia com a correta obtenção do material a ser processado. Por meio da coleta é possível remover amostras de tecido de um determinado organismo. A coleta pode ser feita quando o organismo ainda está vivo, por meio de biópsia, durante uma cirurgia, ou mesmo *post mortem*, durante a realização de necropsia de animais ou seres humanos. Ao se remover qualquer amostra de um organismo, esse material inicia um processo de autólise, ou seja, por não receber o suprimento necessário de oxigênio e de substâncias essenciais à sua homeostase, começa a haver acúmulo de dióxido de carbono nos tecidos e, em suas células, iniciando, então, o processo autolítico, no qual ocorre uma instabilidade na membrana lisossômica promovendo a sua ruptura e, conseqüentemente, a liberação de enzimas que atuam no citoplasma da própria célula, destruindo-a (KUMAR et al., 2008). Assim, ao se analisar as estruturas teciduais de um determinado órgão ao microscópio, é preciso preservar os tecidos, sendo imprescindível a realização do processo de fixação.

2.2 Fixação

A fixação é uma etapa primordial para o estudo anatômico e microscópico de uma doença (HOWAT et al., 2014). O seu objetivo é interromper o metabolismo celular pela estabilização das estruturas e dos componentes bioquímicos intra e

extracelulares, evitando assim, a autólise e a destruição dos componentes teciduais, além de permitir a miscibilidade de outras substâncias subsequentes à fixação. Diversos protocolos de fixação e tipos de fixadores são citados na literatura conforme o tipo de material e a técnica a ser analisada (KAP et al., 2011). Os fixadores podem ser classificados em duas classes conforme o método de fixação: fixadores desnaturantes e fixadores estabilizadores (*cross-linking*) (tabela 1).

Tabela 1. Soluções fixadoras, seu método e composição

Fixador	Método de fixação	Composição
Bouin's	Desnaturação / <i>cross-linking</i>	25% de solução de formaldeído a 37%, ácido picrico a 70%, ácido acético a 5%
Carnoy's	Desnaturação	60% de etanol, 30% de clorofórmio, 10% de ácido acético glacial
Glutaraldeído	Estabilização por ligações cruzadas	Geralmente, 2% v / v de glutaraldeído para água / PBS
Formalina tamponada	Estabilização por ligações cruzadas	10% de solução de formaldeído a 37%, em pH neutro
Paraformaldeído	Estabilização por ligações cruzadas	Geralmente, 4% p / v de paraformaldeído para água / PBS
Zinker's	Desnaturação	Cloreto de mercúrio 5% (p / v), 2,5% de dicromato de potássio (p / v), 5% de ácido acético glacial (v / v), água

Fonte: adaptado de Howat; Wilson, 2014.

Os fixadores a base de aldeídos (formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído) são os mais utilizados nas técnicas histológicas em laboratórios de anatomia patológica por serem mais acessíveis e de uso simples (TIMM, 2005). O mecanismo de ação do formaldeído foi o objeto de estudo de várias pesquisas e ocorre pelas de ligações cruzadas intra e intermoleculares (HOWAT; WILSON, 2014). As principais ligações cruzadas ocorrem entre o grupo amino da lisina favorecendo a formação de pontes de metileno. No entanto, as ligações também podem ocorrer entre os grupos fenol, indol e imidazol, com isso, o formaldeído interage com uma variedade de aminoácidos teciduais como lisina, arginina, tirosina, asparagina, histidina, glutamina e serina (SHI et al., 2000).

Para evitar a oxidação do formaldeído a ácido fórmico, a solução é preparada com substâncias tamponantes, prevenindo a formação de artefatos sob a forma de um pigmento marrom. Tais misturas são capazes de agir sobre os tecidos de forma a buscar a melhor preservação dos elementos teciduais (MOLINARO et al., 2010).

Algumas especificações são necessárias para garantir o sucesso da etapa de fixação, como por exemplo, a espessura do material que não deve ultrapassar 3 mm e o volume do fixador deve ser 20 vezes maior em relação ao tecido a ser fixado, isso faz com que a reação material-fixador seja satisfatória. O tempo de fixação dependerá do tamanho do fragmento do tecido, podendo variar entre 06 e 24 horas (TIMM, 2005).

2.3 Descalcificação

Regiões anatômicas que contêm partes ósseas ou cartilaginosas necessitam de tratamentos a partir de agentes que reagem com o cálcio, isto é, ácidos que transformam os sais de cálcio insolúveis em solúveis e / ou quelantes que absorvem íons de cálcio. A esse procedimento é dado o nome de descalcificação (MATTUELLA et al., 2007). Esta etapa tem por objetivo retirar o fosfato de cálcio do tecido, pois esse componente de cálcio compromete a etapa da microtomia, e, conseqüentemente, impede a confecção de bons cortes levando à formação de artefatos técnicos, limitando a análise histológica adequada.

A descalcificação pode ser feita pela imersão em ácidos ou compostos quelantes. Os desmineralizadores ácidos tais como o ácido fórmico aquoso são amplamente utilizados. No entanto, eles são potencialmente prejudiciais ao tecido, pois podem causar distorção do colágeno e diminuir a afinidade dos corantes histológicos. Esses efeitos são inerentes, na maioria dos casos, da acidez da solução e da duração da descalcificação (FARRAJ et al., 2006).

A descalcificação por agentes quelantes se baseia na sua ligação ao íon cálcio formando um metal quelado. O EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) é um agente quelante hexadentado que extrai cálcio do tecido e é amplamente utilizado por preservar a integridade intercelular e a afinidade de coloração. Assim como as misturas de tampões, o agente quelante inativa a fosfatase alcalina, que é

reativada após um banho de 2 a 6 horas em solução de cloreto de magnésio 6%. A descalcificação por agentes quelantes minimiza a produção de artefatos durante a maioria das colorações histológicas, diferente da descalcificação por ácidos fortes, que gera artefatos quase irreversíveis. O tratamento com EDTA durante 20 dias é apropriado para a descalcificação de estruturas nasais em modelos de ratos de rinite alérgica (GUIBAS et al., 2014).

Uma descalcificação que não prejudique a qualidade do processamento é imprescindível para análise histológica. Para certificar a finalização da descalcificação existem métodos físicos e químicos. Entre os métodos físicos está o teste da agulha, no qual, o operador tenta dobrar a peça ou inserir uma agulha e verificar, assim, o grau de mineralização. Ainda nos métodos físicos, outra opção é teste radiológico: o raio-X é o método mais sensível e confiável para acompanhar a descalcificação. O método químico é realizado com auxílio da solução de oxalato de amônia, a qual detecta a presença de cálcio no líquido descalcificador, se a descalcificação for completa o líquido se manterá límpido, caso contrário, haverá precipitação do cálcio (MOLINARO et al., 2010).

2.4 Processamento histológico

O processamento histológico é fundamentado na difusão de uma sequência de solventes para o interior dos tecidos e na remoção do líquido tecidual. Além disso, é por meio dessa etapa que os fragmentos rígidos se tornam adequados para o seccionamento em finas porções capazes de serem observadas ao microscópio. O processamento é iniciado pela desidratação, em seguida, a clarificação ou diafanização e, por fim, a impregnação e inclusão (Figura 1) (MOLINARIO et al., 2010).

A desidratação consiste na remoção da água dos tecidos, pois as substâncias utilizadas para inclusão em parafina não apresentam boa solubilidade nesse solvente. Dentre os agentes desidratantes, o álcool etílico é o mais utilizado na rotina histológica por apresentar um custo rentável e bons resultados (TIMM, 2005). A literatura ressalta algumas especificações para esta etapa como o volume de álcool necessário para se obter uma desidratação adequada, que deve ser 20 vezes

o volume da amostra. Além disso, é recomendada a agitação constante do recipiente e sucessivas trocas do álcool utilizado, pois, como a água é mais densa do que o álcool, ela tende a se localizar no fundo do frasco após a sua saída do tecido, exatamente no local da amostra (MOLINARIO et al., 2010).

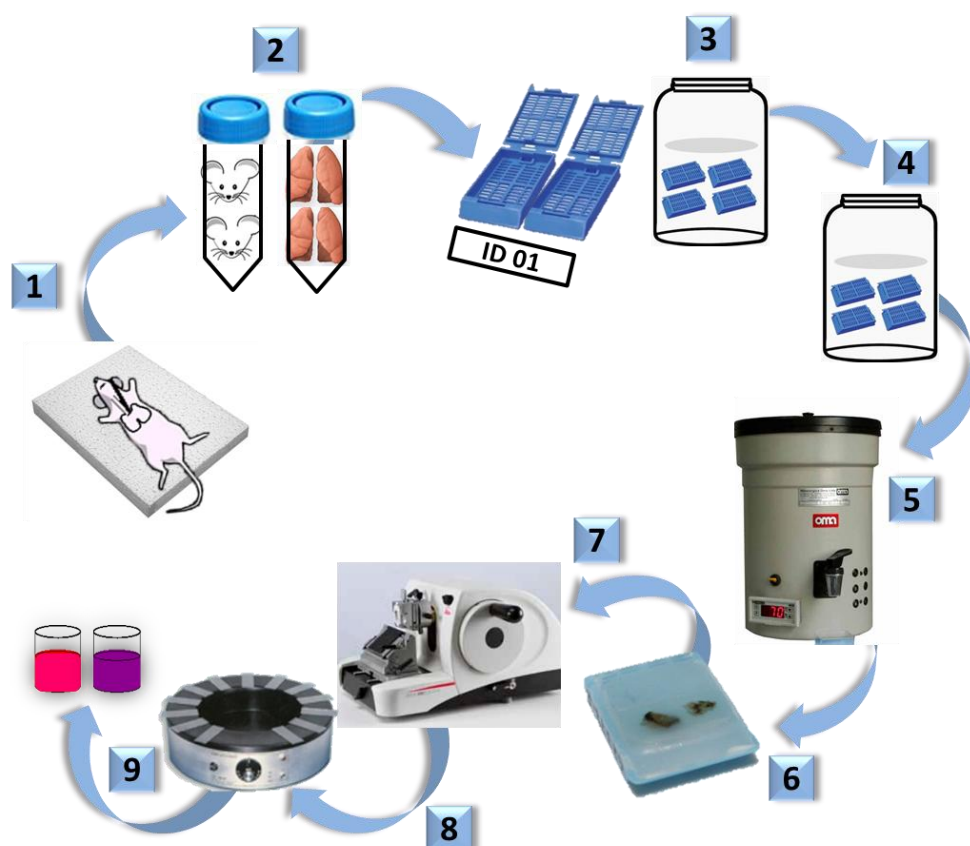


Figura 1. Processamento histológico manual. Etapa: 1- Coleta; 2- Fixação; 3- Desidratação; 4- Clarificação; 5- Impregnação; 6- Emblocagem; 7- Microtomia; 8- Distensão e pesca 9- Coloração

Fonte: adaptado Pereira, 2014.

A clarificação ou diafanização é uma etapa posterior à desidratação, e o seu objetivo é remover completamente o álcool do interior dos tecidos, tornando-os mais lipofílicos para as etapas subsequentes. A remoção do álcool é de extrema importância, pois a parafina utilizada na impregnação não é totalmente miscível no mesmo. Dessa forma, para remover o álcool e preparar o tecido para a penetração da parafina utiliza-se o xilol. Conforme o xilol penetra no tecido, em substituição ao álcool, o material se torna mais claro, transparente. Por essa razão, esta etapa é denominada clarificação (MOLINARIO et al., 2010). Estudos anteriores ressaltam

algumas precauções durante essa etapa, como a troca da solução clarificadora e evitar o contato prolongado do material com o xilol, pois há o ressecamento e endurecimento da amostra interferindo na sua qualidade (MOLINARIO et al., 2010; VIEIRA et al., 2013)

A impregnação é realizada em parafina fundida. Os fragmentos são transportados de uma parafina a outra em intervalos de tempo pré determinados. É necessário o controle do tempo e temperatura, pois como a parafina somente é líquida em temperatura alta, o calor por um longo período de tempo poderá causar grande dano ao tecido. A impregnação em parafina permite o micro seccionamento geralmente em uma espessura de 5-15 μm que equivale a 0,005 - 0,015 mm, conforme mostra a tabela de equivalentes de conversão (Tabela 2).

A inclusão consiste na inserção do tecido mole em uma substância de consistência firme que permita, posteriormente, seccioná-lo em camadas delgadas. Pelo fácil manuseio e bons resultados, a parafina é o item mais utilizado nesse procedimento. Nesta etapa, os tecidos que foram previamente desidratados, clarificados e infiltrados em parafina são inseridos no interior de um molde que já contém parafina líquida com a superfície a ser seccionada. É obtido, ao final desta etapa, um bloco de parafina já solidificada, devidamente identificado.

Tabela 2. Equivalentes lineares de conversão

Medida	Equivalente
1 picômetro (pm)	0,01 ângstrom (Å)
1 ângstrom	0,1 nanômetro (nm)
10 ângstroms	1,0 nanômetro
1 nanômetro	1.000 picômetro
1.000 nanômetro	1,0 micrômetro (μm)
1.000 micrômetros	1,0 milímetro (mm)

Fonte: adaptado Ross; Pawlina, 2012

2.5 Microtomia

Para tornar possível a análise dos tecidos ao microscópio óptico, eles devem ser seccionados em fatias bem finas e uniformes. A espessura ideal varia de acordo com o objetivo de estudo; recomenda-se a espessura de 4 a 6 μm na rotina dos laboratórios. Essas secções são obtidas a partir do micrótomo, instrumento capaz de confeccionar cortes com precisão. Tal instrumento é constituído por três partes: base, porta bloco e porta navalha (Figura 2). Considera-se, ainda, que em alguns modelos possua duas manivelas, uma manivela de ajuste e outra de corte.

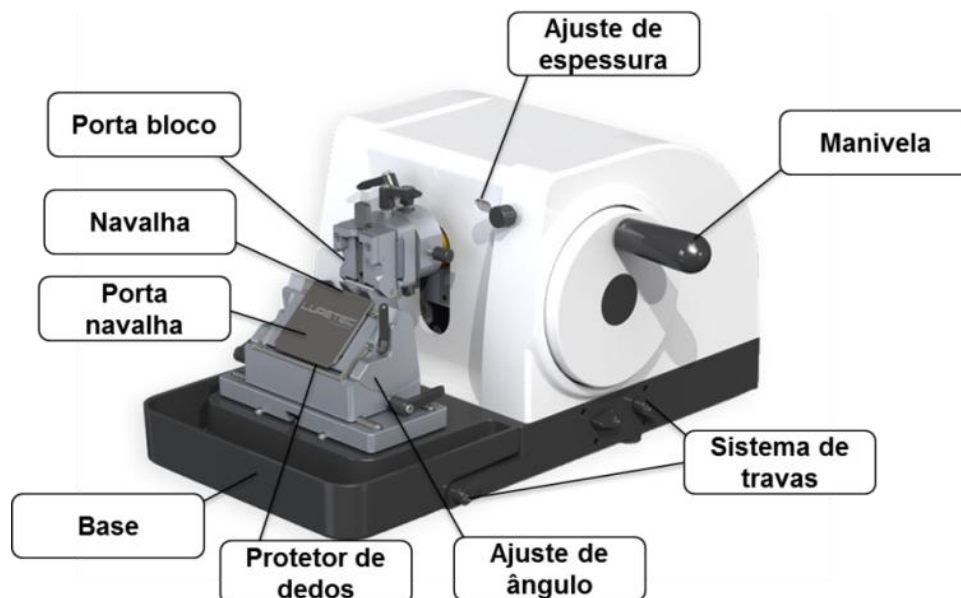


Figura 2. Micrótomo (LEICA) utilizado para secção dos cortes. Equipamento e suas partes.

Fonte: adaptado <https://lupetec.com.br/>

2.6 Coloração

Corantes são compostos orgânicos aromáticos formados estruturalmente por cromógeno e auxocromo. Os cromógenos são compostos benzênicos contendo grupamentos que conferem a cor e o auxocromo é o grupamento auxiliar do corante que cora seletivamente os componentes teciduais como as células e a matriz extracelular (Figura 3). Os corantes são fundamentais para visualizar os tecidos ao microscópio óptico, pois, após a microtomia, as células e o material extracelular são habitualmente transparentes e os corantes proporcionam uma melhor visualização e diferenciação das estruturas teciduais.

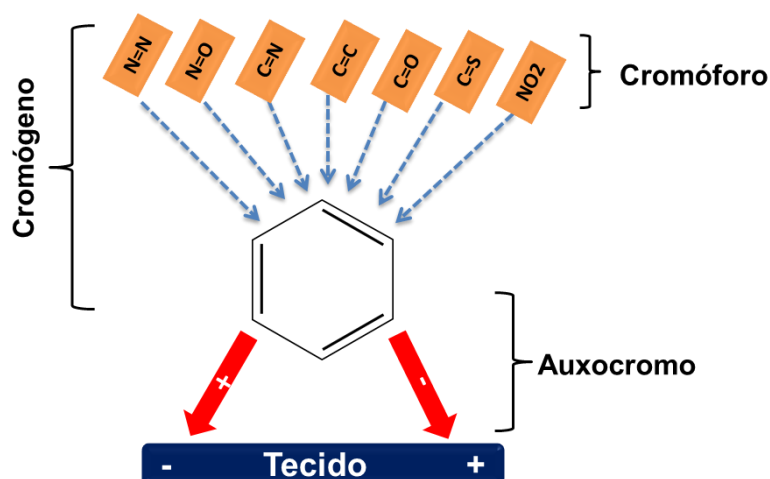


Figura 3. Mecanismo da associação dos corantes com os componentes teciduais.

Fonte: adaptado Molinario et al., 2010

Conforme a carga iônica, os corantes podem ser ácidos, básicos ou neutros. Os corantes ácidos apresentam auxocromo aniônico (carga elétrica negativa (-)), com afinidade por componentes básicos dos tecidos, agente catiônico (carga elétrica positiva (+)). As estruturas coradas pelos corantes ácidos são chamadas acidófilas, como, por exemplo, o citoplasma e matriz extracelular. Um exemplo de corante ácido é a eosina, o qual pode ser descrito por uma fórmula geral $\text{Na}^+ \text{eosina}^-$. Já os corantes básicos possuem auxocromo catiônico (carga elétrica positiva (+)) com afinidade por componentes ácidos dos tecidos, componentes aniônicos (carga

elétrica negativa (-)). Os componentes aniônicos incluem grupos fosfatos de ácidos nucleicos, grupos sulfatos de glicosaminoglicanos e grupos carboxílicos de proteínas. A propriedade de estruturas teciduais aniônicas como o núcleo reagirem com corantes básicos é denominada de basofilia. O azul de toluidina é um exemplo clássico de corante básico (ROSS; PAWLINA, 2012).

A cor de um corante não está relacionada com a sua propriedade ácida ou básica como pode ser observado pelos exemplos de corantes listados (Tabela 3).

Tabela 3. Exemplos de corantes ácidos e básicos

Corante	Cor
Corantes básicos	
Verde de metila	Verde
Azul de metileno	Azul
Pironina G	Vermelho
Azul de toluidina	Azul
Corantes ácidos	
Fucsina ácida	Vermelho
Azul de anilina	Azul
Eosina	Vermelho
Laranja G	Laranja
Mistura tricrômica	Verde – vermelho

Fonte: adaptado Ross; Pawlina, 2012

Embora a ligação eletrostática seja o principal fator na ligação primária de um corante ácido com o tecido, ela não é o único; por causa disso, os corantes ácidos são, por vezes, utilizados em combinações para corar diferentes constituintes teciduais de maneira seletiva. Uma particularidade interessante dos corantes é demonstrada, por exemplo, na capacidade da fucsina básica de reagir com os grupamentos aldeídos resultando em uma nítida coloração vermelha, base das reações do ácido periódico de Schiff (PAS). A reação do PAS cora carboidratos e macromoléculas ricas em carboidratos, sendo utilizada para demonstrar o glicogênio nas células, o muco em várias células e tecidos, a membrana basal subjacente aos epitélios e as fibras reticulares no tecido conjuntivo (ROSS; PAWLINA, 2012).

2.7 Desordens respiratórias: abordagem morfológica

As Doenças Respiratórias Crônicas (DRC) mais comuns são asma, rinite alérgica e a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). As DRCs estão aumentando a prevalência particularmente entre as crianças e idosos. Afetam a qualidade de vida e podem provocar a incapacidade nos indivíduos afetados, causando grande impacto econômico e social. As limitações físicas, emocionais e intelectuais que surgem com a doença, com consequências na vida do paciente e da sua família, geram sofrimento humano (Ministério da Saúde, 2010).

2.7.1 Sistema respiratório

Três funções principais são executadas pelo sistema respiratório: condução do ar, filtração do ar e troca gasosa. Além disso, a passagem de ar pela laringe é responsável pela produção da fala, e a passagem do ar pela mucosa olfatória nas cavidades nasais exerce estímulos para o olfato. O sistema respiratório também participa, em menor proporção, nas funções endócrinas, bem como a regulação da resposta imune a antígenos inalados (MANDHANE et al., 2011).

O sistema respiratório, didaticamente, é dividido em duas regiões funcionais: as vias aéreas condutoras e a região respiratória. Do volume total pulmonar, apenas cerca de 10% é ocupado pelas vias aéreas condutoras que filtram e conduzem o ar inspirado e mais da metade é representado pelo próprio parênquima pulmonar, região na qual ocorrem as trocas gasosas. As vias aéreas condutoras são representadas pela cavidade nasal, seios paranasais, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos. Já as estruturas respiratórias são os bronquíolos respiratórios, ductos e sacos alveolares (TRONDE et al., 2007) (Figura 4).

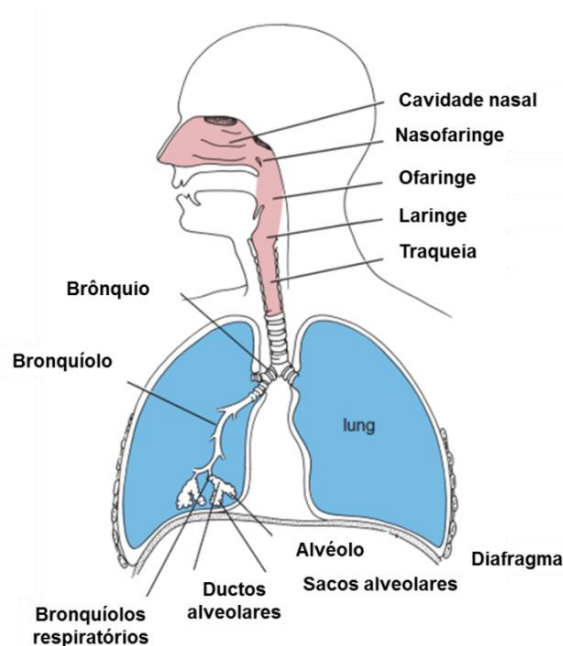


Figura 4. Vias respiratórias e suas regiões. Porção condutora: cavidade nasal, nasofaringe, orofaringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos. Porção respiratória: bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos.

Fonte: adaptado Ross; Pawlina, 2012.

A cavidade nasal é dividida em três regiões: o vestíbulo nasal, a região respiratória e a região olfatória (Figura 5). O vestíbulo nasal é a região interior das narinas, composto pelo epitélio pavimentoso estratificado, como uma continuação da pele da face, e contém um número variável de vibrissas que capturam grandes partículas antes de serem transportadas no fluxo de ar para o resto da cavidade. As glândulas sebáceas estão também presentes, e suas secreções auxiliam na retenção de partículas (GUIBAS et al., 2014).

Posteriormente, onde termina o vestíbulo, o epitélio pavimentoso estratificado sofre uma transição para epitélio colunar pseudoestratificado ciliado que caracteriza a região respiratória que constitui a maior parte do volume da cavidade nasal. Neste local, as glândulas sebáceas estão ausentes.

A região respiratória é revestida pela mucosa respiratória que contém um epitélio em sua superfície. Na área subjacente a lâmina própria está o perióstio e pericôndrio do osso. A parede medial da região respiratória, ou septo nasal, é lisa, mas as paredes laterais são diferenciadas pela presença de sub-regiões, ou projeções ósseas chamadas conchas ou cornetos. As conchas dividem cada cavidade nasal em câmaras de ar e desempenham um duplo papel. Elas aumentam

a área de superfície e causam turbulência no fluxo de ar para permitir um condicionamento do ar inspirado (KIERSZENBAUM, 2008).

O epitélio da mucosa respiratória apresenta cinco tipos de células: células ciliadas que revestem a superfície do epitélio; células caliciformes que sintetizam e secretam muco; células em escova que apresentam microvilosidades; células do Sistema Neuroendócrino Difuso (SNED) ou células Kulchitsky que se assemelham às células basais, porém contêm grânulos secretores; e as células basais, que são células-tronco das quais surgem outros tipos celulares do epitélio da região respiratória da cavidade nasal (ROSS; PAWLINA, 2012).

Na região olfatória, o tecido conectivo contém numerosos vasos linfáticos, nervos olfatórios não mielinizados e mielinizados e glândulas olfativas. O epitélio olfatório, é também pseudoestratificado, entretanto, não contém células caliciformes. Sua composição celular se baseia nos seguintes tipos de células: células receptoras olfatórias que são neurônios bipolares; As células de sustentação, são células colunares semelhantes às células da neuroglia que fornecem suporte metabólico para as células receptoras olfativas e sintetizam e secretam proteínas de ligação aos odorantes. As células basais, progenitoras, a partir das quais as células receptoras e células de suporte se diferenciam. As células em escova são do mesmo tipo de células que ocorrem no epitélio respiratório e estão envolvidas na transdução da estimulação sensorial geral da mucosa e não estão envolvidas com a olfatação (ROSS; PAWLINA, 2012).

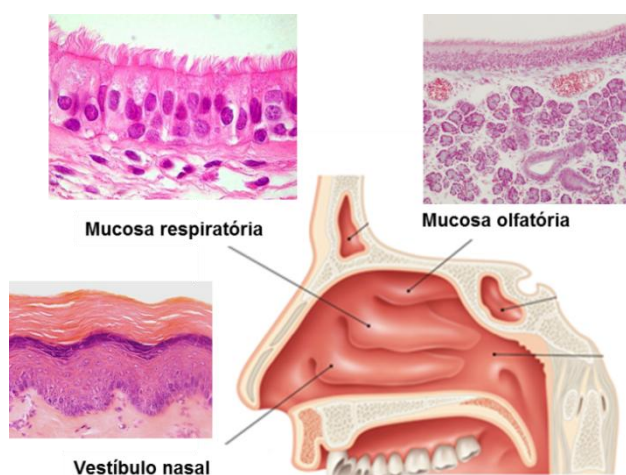


Figura 5. Cavidade nasal dividida em três regiões: o vestibulo nasal, a região respiratória e a região olfatória

Fonte: adaptado Webnode, 2014 <http://sistema-respiratorio.webnode.com/nariz/>

Mais internamente, a traqueia e os brônquios apresentam vários tipos celulares, como, células basais, células caliciformes, células ciliadas, células em escova e células neuroendócrinas. Células transitórias em situação de migração celular também podem estar presentes no epitélio, tais como, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e mastócitos. Nos bronquíolos terminais, o epitélio é composto por células ciliadas e células de clara. O epitélio alveolar contém dois tipos de células: pneumócito tipo I e pneumócito tipo II. As células pavimentosas tipo I compõem a parede alveolar e revestem 80% da área de superfície alveolar; as células cúbicas tipo II recobrem a área restante e são responsáveis pela síntese e secreção de moléculas surfactantes que diminuem a tensão superficial e regulam o equilíbrio de fluidos no epitélio alveolar. As células alveolares tipo II podem regenerar as células tipo I após um processo de lesão (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

No espaço extracelular e extravascular, denominado de interstício pulmonar, e entre as células do tecido, há uma variedade de células como, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, miofibroblastos, além de colágeno, fibras elásticas e fluido intersticial. Os vasos linfáticos compõem a principal via de drenagem para o fluido intersticial entre o epitélio e a membrana basal endotelial (TRONDE et al., 2007).

2.7.2 Doenças alérgicas das vias aéreas

Doenças alérgicas são caracterizadas pela resposta imune tipo II (T_H2) mediado pela imunoglobulina E (IgE). Essa resposta imunológica ocorre quando o alérgeno se liga à IgE fixada aos mastócitos teciduais ou aos basófilos circulantes, proporcionando o movimento dos grânulos intracelulares para membrana celular e consequente liberação dos mediadores pró inflamatórios característicos de várias doenças alérgicas como asma e rinite (BROIDE et al., 2011).

Os mediadores inflamatórios são responsáveis pela caracterização do quadro e o aparecimento das manifestações clínicas. Nas vias aéreas superiores observam-se os sintomas como espirros, prurido, congestão nasal, rinorreia, lacrimejamento e a perda da sensibilidade ao cheiro e gosto. Já nas vias aéreas inferiores, são observados na fase precoce os sintomas como obstrução do fluxo aéreo, broncoespasmo e edema. Tardamente, a inflamação das vias aéreas pode

se tornar crônica ocorre, então, a hiper-reatividade brônquica ocasionando a asfixia e o sibilo variando conforme a severidade (BURNAY et al., 2013).

Em termos morfológicos, as doenças alérgicas das vias aéreas são caracterizadas por numerosas mudanças teciduais, incluindo a perda da integridade epitelial, espessamento da membrana basal, hiperplasia das glândulas da mucosa, fibrose subepitelial e deposição de colágeno, elastose e fragmentação das fibras elásticas, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas e células caliciformes e aumento do número de vasos (LEE et al., 2017). A fisiopatologia do remodelamento das vias aéreas envolve interações entre uma variedade de células, principalmente eosinófilos, linfócitos T, células musculares lisas, células epiteliais, fibroblastos e mastócitos (GIRODET et al., 2011).

Os mastócitos desempenham um importante papel nas doenças alérgicas por liberar, após ativação celular, vários mediadores como a histamina, leucotrienos e prostaglandinas que são liberados após ativação celular (BAFADHEL et al., 2012). Os mastócitos de mucosa são recrutados para superfície das vias aéreas pelo seu fator de célula tronco SCF (*Stem Cell Factor*), citocinas produzidas por diversos tipos celulares que se ligam a seu receptor c-kit, uma tirosina quinase expressa em todas as células tronco hematopoiéticas (CTH), podendo ser também liberado pelas células epiteliais (ABDELHAY et al., 2009).

O infiltrado inflamatório que ocorre nas doenças alérgicas das vias aéreas é frequentemente descrito como eosinofílico. Em respostas às interleucinas liberadas por linfócitos T_H2, eosinófilos são produzidos e recrutados da circulação para o foco da inflamação onde passam a modular a resposta imunológica. A resposta eosinofílica leva a secreção de citocinas, como as interleucinas, dentre elas IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, fator de transformação do crescimento (TGF - β - *Transforming Growth Factor Beta*) e quimiocinas como a eotaxina-1. Além disso, eosinófilos podem atuar na indução de danos e disfunção tecidual por liberar grânulos tóxicos de proteínas como o grânulo da proteína básica principal (MBP- *Major Basic Protein*) cujos efeitos nocivos já foram descritos na asma e na rinosinusite crônica (PONIKAU et al., 2003).

Essas moléculas exercem efeitos pró-inflamatórios como aumento do sistema de adesão, modulação do trânsito de células, ativação e regulação da

permeabilidade vascular, secreção de muco e contração de músculo liso. Os indícios de tais efeitos podem ser observados na análise dos parâmetros teciduais das vias aéreas que apresentem doenças alérgicas.

2.7.3 Lesão pulmonar aguda

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome de insuficiência respiratória aguda, resultante de lesões no parênquima que, se não tratada, pode levar a forma mais grave da doença denominada síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (MATTHAY; ZEMANS, 2011). A taxa de mortalidade em pacientes com SDRA é, em torno de, 40% devido ao lento progresso na compreensão dos mecanismos responsáveis pela patogênese da doença, uma vez que suas principais causas são doenças infecciosas, como pneumonia e sepse (SPRAGG et al., 2010). Apesar dos esforços na pesquisa básica e clínica, a mortalidade da SDRA permanece relativamente inalterada. Diversas estratégias foram testadas para tentar reverter a hipoxemia, inclusive alternativas ventilatórias, inalação de vasodilatadores e oxigenação extracorpórea por membrana. Embora melhorem a oxigenação, não garantem a cura (ARDUINI et al., 2016).

No tecido pode-se observar a formação de lacunas intercelulares no endotélio, funcionando como base para o aumento da permeabilidade microvascular. A lesão epitelial leva ao transporte de fluido e células e conseqüentemente a formação do edema pulmonar. Em conjunto com as lesões endoteliais e o edema pulmonar, há um intenso fluxo de neutrófilos para o interstício e espaço broncoalveolar. A ativação e transmigração dos neutrófilos desempenham um papel fundamental na progressão da LPA / SDRA (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Em humanos, a análise histopatológica demonstrou que a LPA é caracterizada por uma resposta inflamatória aguda e alveolite neutrofílica (MEI et al., 2007).

A fase final da doença pode resultar em morte ou recuperação. A morte geralmente está associada com o desenvolvimento de falência múltipla dos órgãos. O sucesso da resolução da doença pode estar relacionado às mudanças histológicas características dos alvéolos. Os neutrófilos são substituídos por macrófagos alveolares e ocorre reposição epitelial, reabsorção do fluido alveolar,

fagocitose de resíduos de proteínas associadas ao influxo do edema e finalmente, resolução de fibrose (ANGUS, 2012).

Em modelo animal de LPA, a ligação do LPS (lipopolissacarídeo) aos seus receptores (*Toll Like Receptors* - TLRs) presentes em células pulmonares inicia a inflamação pulmonar aguda (MATTHAY et al., 2012). As citocinas e quimiocinas são secretadas a partir do epitélio pulmonar e estimulam os macrófagos a iniciar o recrutamento dos neutrófilos nos espaços aéreos através da barreira alvéolo-capilar (BHATIA et al., 2012). Uma vez ativados, os neutrófilos liberam uma variedade de mediadores, como proteases, espécies reativas de oxigênio (ERO), histonas e peptídeos responsáveis pela lesão no endotélio vascular e no próprio epitélio alveolar (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Em consequência, há o aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar levando ao acúmulo de fluido extravascular rico em proteínas, a perda da integridade e a diminuição da capacidade para remoção de líquidos e produção de surfactante agravam o edema pulmonar (MATTHAY; ZEMANS, 2011) (Figura 6).

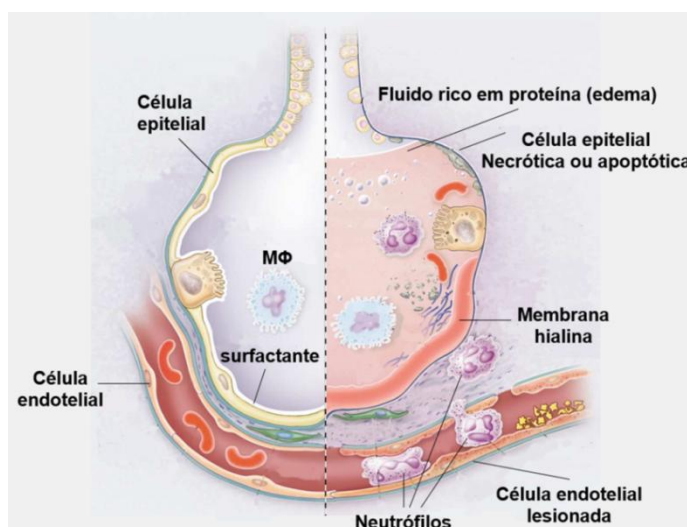


Figura 6. Na fase aguda da síndrome (lado direito), é ilustrado o desprendimento de ambas as células epiteliais brônquicas e alveolares, com a formação de membranas hialinas, ricas em proteínas, na membrana basal alterada. Os neutrófilos são mostrados aderindo ao endotélio capilar lesionado e atravessando o interstício para o espaço aéreo, que está preenchido com fluido de edema rico em proteínas. No espaço aéreo, macrófago alveolar secreta citocinas (IL-1, 6, 8 e 10) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) os quais atuam localmente para estimular a quimiotaxia e ativar neutrófilos. Neutrófilos podem liberar oxidantes, proteases, leucotrienos, e outras moléculas pró-inflamatórias, tais como fator de ativação plaquetária (PAF).

Fonte: adaptado Matthay, 2011.

2.8 Problemática

Considerando as utilidades das técnicas histológicas e os trabalhos pré-clínicos, já desenvolvidos no Laboratório de Imunofarmacologia / UFPB / IPeFarM / PB em modelos experimentais de desordens respiratórias, o estudo das células, matriz extracelular, tecidos e órgãos em modelos experimentais foi importante para fundamentar o estudo morfológico e oportunizar a inserção de substâncias na busca por novas opções de tratamento. Além disso, foi observada a necessidade do desenvolvimento, implantação e padronização das técnicas histológicas no próprio laboratório, visto que, seus integrantes se deslocavam para instituições em outras cidades para realizá-las.

O estudo das alterações morfológicas das desordens respiratórias, além de contribuir com a pesquisa em doenças alérgicas na busca por novas formas de tratamentos, proporcionou a realização de diversas atividades tais como: levantamento bibliográfico sobre o objeto em estudo em revistas internacionais; realização das técnicas laboratoriais na tentativa de responder os questionamentos levantados no estudo; interpretação dos resultados obtidos; potencialização do raciocínio crítico e científico contribuindo para o desenvolvimento da habilidade de escrever artigos e apresentação dos resultados em eventos da área.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Implantar técnicas histológicas no laboratório de Imunofarmacologia / IPeFarM/ UFPB possibilitando a avaliação morfológica e histoquímica do tecido nasal e pulmonar de camundongos BALB / c, após o desenvolvimento dos modelos experimentais de doenças alérgicas e lesão pulmonar aguda, respectivamente.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Implantar o protocolo de coloração hematoxilina eosina (H&E) para avaliação da migração celular e outros parâmetros inflamatórios;
- ✓ Implantar o protocolo de coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) para observação de células produtoras de muco;
- ✓ Implantar o protocolo de coloração azul de toluidina (AT) para observação de mastócitos;
- ✓ Implantar o protocolo de coloração tricrômica de gomori (TG) para identificar a presença de fibras colágenas.
- ✓ Avaliar a relação entre modelo experimental e número de células nos lavados broncoalveolar e nasal;
- ✓ Identificar as características histológicas das desordens respiratórias estudadas;
- ✓ Caracterizar as diferenças teciduais entre as desordens respiratórias experimentais;

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Durante a realização dos modelos experimentais de doenças alérgicas das vias aéreas e LPA, foram utilizados camundongos BALB / c fêmeas com idade de 6 a 8 semanas pesando 22 ± 2 g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 ° C e submetidos a ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h às 18h claro e de 18h às 6h escuro) com livre acesso à água e ração do tipo *pellets* (PURINA®) durante todo o período experimental. Os camundongos, dispostos em 05 animais por grupo, foram fornecidos pelo biotério Professor Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CBIOTEC / UFPB Nº 1705/13. A manipulação dos animais foi baseada no guia de cuidado animal (SHERWIN et al., 2003). Os animais foram eutanasiados por overdose de solução anestésica (Xilazina 20 a 30 mg / kg + quetamina 200 a 300 mg / kg), administrada via intramuscular (IM), conforme a Resolução Normativa Nº 13, de 20.09.2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Durante a implantação das técnicas histológicas, os animais foram divididos em 3 grupos, conforme o modelo experimental utilizado. Para o modelo de doenças alérgicas das vias aéreas (rinite e asma) os animais foram separados nos seguintes grupos: basal, ovalbumina (OVA) e budesonida (BUD). Já para o modelo de LPA, os animais foram divididos em grupo basal, lipopolissacarídeo (LPS) e dexametasona (DEXA) (Tabela 4). Os camundongos utilizados no projeto “1,4 cineol reduz o recrutamento de neutrófilos via polarização para macrófagos M2 em modelos de inflamação e na lesão pulmonar aguda experimental (tese do PgPNSB/UFPB/JP/PB)” serviram de fonte para os órgãos utilizados na análise histológica da LPA.

Tabela 4. Divisão dos grupos experimentais

	CARAS	LPA
Basal - Animal fisiológico	X	X
OVA - Animal sensibilizado e desafiado com OVA a 5%	X	
BUD - Animal sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com budesonida 0.9 mg / kg por via intranasal (i.n).	X	
DEXA - Animal sensibilizado, desafiado com OVA ou LPS e tratado com dexametasona 2 mg / kg, via intraperitoneal (i.p).		X
LPS - Animal desafiado com 50 µL de LPS (1 mg / kg) via i.n.		X

3.2 Substâncias e sais

Ácido clorídrico (HCl) – VETEC

Ácido etilenodiamino tetra-acético (C₁₀H₁₆N₂O₈) - SIGMA

Ácido fosfotungústico (H₃P₁₂O₄₀) – VETEC

Ácido orto-periódico (H₅IO₆) – VETEC

Aldeído fórmico (CH₂O) – MERCK

Bálsamo do Canadá - VETEC

Bissulfito de sódio (NaHSO₃) – MERCK

Carvão ativado – VETEC

Cloreto de sódio (NaCl) – SIGMA

Cloridrato de ketamina – VETBRANDS

Corante cromotrope 2R – VETEC

Corante azul de toluidina - POLYSCIENCES

Corante eosina amarelada – VETEC

Corante fucsina básica – VETEC

Corante hematoxilina – VETEC

Corante test – green – VETEC

Dexametasona – MESE

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) – VETEC

Fosfato de potássio (KH_2PO_4) – REAGEN

Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) - SIGMA

Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) - SIGMA

Glicerina ($\text{CH}_2\text{OHCH}_2\text{OH}$) – VETEC

Gelatina em pó – VETEC

Hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) – VETEC

Hidróxido de sódio (NaOH) – REAGEN

Metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) – MERCK

OVA grade II – SIGMA

OVA grade V – SIGMA

Parafina para histologia – ISOFAR

Xilol ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$) – VETEC

3.3 Soluções

Tabela 5. Solução salina

Substância	Quantidade
NaCl	9 g
Água destilada	1000 mL

Inicialmente foi colocado o soluto e depois foi adicionada a água até a obtenção do volume desejado.

Tabela 6. Solução anestésica

Substância	Quantidade
Xilasina	1 mL
Quetamina	3 mL
Salina	8 mL

Em um recipiente estéril, as substâncias anestésicas foram diluídas em quantidade relatada de salina obtendo a solução esperada após homogeneização.

Tabela 7. Solução descalcificadora EDTA em tampão fosfato 0,1 M

Substância	Quantidade
Tampão fosfato 0,1 M	
Solução A	
Fosfato de sódio monobásico	13,7 g
Água destilada	1000 mL
Solução B	
Fosfato de sódio dibásico	35,8 g
Água destilada	1000 mL
Solução de uso	
EDTA	100 g
Tampão fosfato 0,1 M	1000 mL

A solução descalcificadora foi preparada a partir do sal diluído no tampão. A amostra foi introduzida no líquido descalcificador com o volume igual ou superior a vinte vezes o volume da peça. A solução foi renovada diariamente e mantida em agitação. Foi aferido o pH da solução e diariamente a solução era renovada. Foi realizado o teste mecânico da amostra (teste da agulha) a fim de se verificar a eficiência do processo de descalcificação.

Tabela 8. Composição da formalina tamponada

Substância	Quantidade
Aldeído fórmico 37%	100 mL
Água destilada	900 mL
Fosfato de sódio monobásico	4 g
Fosfato de sódio dibásico	4,5 g

Para o preparo da solução fixadora eram dissolvidos os sais em água destilada com auxílio do agitador magnético. O volume de aldeído fórmico, previamente aferido, foi adicionado à solução tamponada atingindo o volume final. Após o preparo, as amostras permaneceram 24 horas sob fixação.

Instruções de biossegurança são importantes ao manipular formaldeído ou soluções que contêm essa substância. As luvas, máscaras com filtro próprio para vapores orgânicos devem ser utilizados. O preparo de soluções fixadoras foi feito em capela de exaustão. Por serem muito voláteis e sensíveis à luz, as soluções contendo formaldeído foram em vidro âmbar firmemente fechado.

Tabela 9. Composição da hematoxilina de Harris

Substância	Quantidade
Hematoxilina	5 g
Alúmen de potássio	50 g
Óxido de mercúrio	2,5 g
Alcool absoluto	50 mL
Água destilada	1000 mL
Ácido acético 1% (opcional)	40 mL

Tabela 10. Composição da Eosina Y ou amarelada

Substância	Quantidade
Eosina Y	5 g
Água destilada	50 mL
Álcool 95 %	450 mL
Ácido acético glacial (opcional)	10 gotas

A eosina foi dissolvida em água destilada e em seguida foi acrescentado o álcool. A adição do ácido acético aumenta a intensidade da coloração, entretanto, diminui a durabilidade do corante. A solução foi mantida na geladeira e antes do seu uso foi filtrada.

Tabela 11. Composição da mistura Tricrômica de Gomori

Substância	Quantidade
Cromotopo 2R	0,6 g
Verde luz	0,3 g
Ácido fosfotungstístico	0,6 g
Álcool absoluto 95°	50 mL
Ácido acético	1 mL
Água destilada	100 mL

Obs: O verde luz pode ser substituído pelo azul de anilina ou fast green

Tabela 12. Composição do azul de toluidina

Substância	Quantidade
Azul de toluidina	1 g
Ácido acético	1 mL
Água destilada	99 mL

Tabela 13. Composição do ácido periódico a 1%

Substância	Quantidade
Ácido periódico	1 g
Água destilada	100 mL

Tabela 14. Composição do Reativo de Schiff

Substância	Quantidade
Fucsina básica	4 g
Metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	8 g
Carvão ativado	4 g
Ácido clorídrico 1N	80 mL
Água destilada	400 mL

Para o preparo deste reativo, a fucsina básica foi dissolvida em água destilada quente. Em seguida foi mantida a temperatura ambiente até atingir 60°C. O metabissulfito de sódio e o ácido clorídrico foram adicionados. É interessante seguir esta ordem para evitar acidentes de trabalho inerente ao ácido utilizado. A solução foi agitada e protegida da luz. O carvão ativado foi adicionado e agitado por um minuto prosseguindo com a filtração. A etapa de filtração foi repetida até a obtenção da solução incolor.

Algumas particularidades sobre o reativo de Schiff são relevantes enumerar:

1. O reativo foi apresentado com aspecto límpido;

2. A fim de testar o reativo, foram gotejados nele 3 mL de formol a 10%. Se a solução ficasse vermelho púrpura escuro, o reativo poderia ser utilizado;
3. O reativo não foi guardado ao abrigo da luz.

Tabela 15. Composição do banho sulfuroso

Substância	Quantidade
Água sulfurosa	
Bissulfito de sódio 10 %	10 mL
Água destilada	200 mL
HCl 1 N	10 mL
Bissulfito de sódio 10 %	
Bissulfito de sódio ou metabissulfito de sódio	10 g
Água destilada	100 mL
Solução de Ácido clorídrico 1%	
Ácido clorídrico 37%	1 mL
Água destilada	100 mL

O corante foi dissolvido em água destilada e acrescentado o álcool. O hidróxido de sódio foi gotejado sob agitação, analisado ao pHmetro e após atingir o pH desejado, a solução descansou por 2 horas antes da adição da solução do cloreto de sódio. O cloreto foi adicionado sob agitação, lentamente, sob luz forte até aparecer o precipitado. A durabilidade desta solução a temperatura ambiente é em torno de 1 mês, esse período pode ser aumentado mantendo a solução na geladeira.

3.4 Equipamentos

Agitador magnético	VWR Scientific Products
Agitador vortex	Biomixer QL 901
Balança analítica	Marte AY220
Banho histológico	OMA BM-03DT
Copos de impregnação	ANCAP
Dispensador de parafina histológica	Oma IO-88D
Estufa	Socc. Fabbe LTDA
Microscópio óptico	Nikon
Micrótomo	Leica RM 2125 -RT
Nebulizador	Respira max NS
Refrigerador	Esmaltec
VWR	(Scientific Products)
Agitador vortex	Biomixer QL 901

3.5 Modelos experimentais de desordens respiratórias

3.5.1 Modelo de Síndrome Alérgica de Rinite e Asma Combinadas (CARAS)

O modelo de CARAS ou hipersensibilidade imediata induzida por ovalbumina (OVA), foi desenvolvido tendo como base a adaptação do protocolo experimental de LI et al., 2015. Os camundongos BALB / c fêmeas foram sensibilizados, no primeiro e no décimo segundo dia do protocolo experimental, com uma suspensão contendo 50 µg / mL de OVA (grade V Sigma) e 10 mg / mL de hidróxido de alumínio (VETEC®) em solução salina. Essa suspensão foi administrada via intraperitoneal (IP) na dose de 100 µL / 10 g do animal. Após a sensibilização, os animais foram desafiados com aerossol de OVA grade II (SIGMA®) a 5% em solução salina com intervalos de 24h por 5 dias consecutivos. Os desafios foram realizados durante 30 minutos diários em uma câmara fechada, sob um fluxo contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultrassônico (Respira max NS®).

Os camundongos foram distribuídos em três grupos (n=5):

- Grupo basal (Basal) – animais fisiológicos;
- Grupo OVA (OVA) – sensibilizado e desafiado com OVA e não tratado;
- Grupo Budesonida (BUD) – sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com budesonida na dose de 0.9 mg / kg por via intranasal (IN).

Após 24 horas do último desafio com OVA (dia 36) os animais foram eutanasiados com solução anestésica de quetamina e xilasina administrada por via intramuscular (IM) em uma das patas posteriores para coleta da cabeça e pulmão e seu posterior processamento histológico (Figura 7).

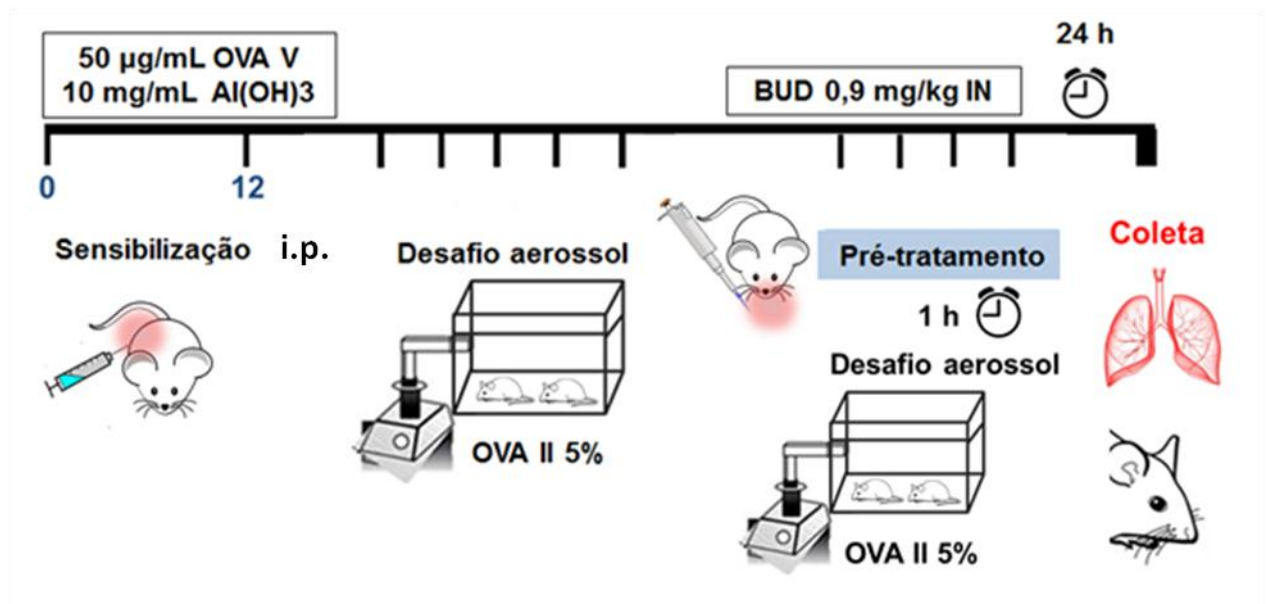


Figura 7. Esquema representativo do modelo experimental de Síndrome Alérgica de Rinite e Asma Combinadas (CARAS)

Fonte: Pereira, 2016

3.5.2 Modelo de Lesão Pulmonar Aguda (LPA)

Com a finalidade de implantar as técnicas histológicas no modelo de LPA, os camundongos BALB / c (n=5) foram tratados com dexametasona (2 mg / kg, IP) ou veículo (IP), 1 hora antes do desafio. Posteriormente, os animais foram anestesiados com 300 µL de uma injeção intramuscular de xilazina e quetamina e por via intranasal foram desafiados com 50 µL da solução de lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli* - Sigma-Aldrich®) (1 mg / kg) ou PBS. Os tratamentos foram

realizados 24 e 48 horas depois do desafio com o LPS. Os camundongos foram eutanasiados 3 dias após o desafio com LPS por overdose de anestésico para coleta do BAL e do pulmão (Figura 8).

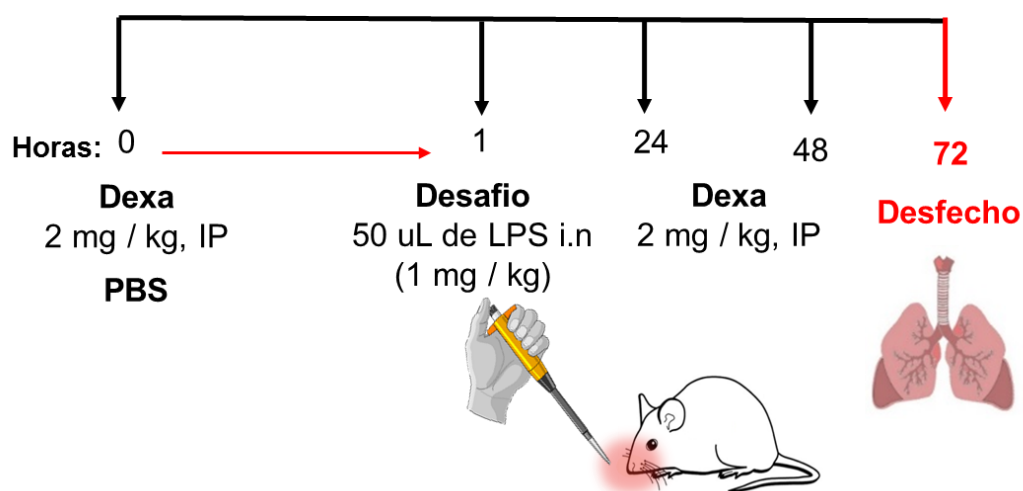


Figura 8. Esquema representativo do protocolo de LPA em modelo animal

Fonte: Leite, 2016

3.6 Coleta dos fluidos do lavado nasal e bronco alveolar para contagem celular

Para a coleta dos fluidos, primeiramente, os camundongos foram eutanasiados com solução anestésica e em seguida foi feita a antissepsia do tórax e pescoço do animal com álcool a 70°. A traqueia foi isolada com auxílio de instrumental cirúrgico (pinça e tesoura). Uma cânula de poliestireno foi introduzida na traqueia do animal no sentido traqueia-cavidade nasal para coleta do NALF e posteriormente traqueia-pulmão para o BAL. Para obter cada lavado foi administrado através da cânula 1,0 mL de *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) na cavidade. O líquido após lavar a cavidade foi coletado em tubo tipo cônico. Os fluidos foram mantidos em baixa temperatura (6°C) para conservação da viabilidade celular (WANG et al., 2013) e posteriormente foram utilizados para contagem total e diferencial das células.

A contagem do número total de células nos lavados foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando uma alíquota da amostra previamente homogeneizada e diluída em Solução de *Turk* na proporção 1:2 para o NALF e 1:4 para o BAL. A

leitura foi feita no microscópio óptico em objetiva de 40x. Após contagem foi realizado o cálculo do número de células = $n \times d \times 10^4$, no qual n: média do número de células contadas nos quatro quadrantes, d: diluição da amostra e 10^4 : diluição padrão da câmara de Neubauer.

Para contagem diferencial das células, 150 a 200 μ L de cada lavado foram distribuídos igualmente por lâmina nos dois poços de uma cito centrífuga (*cytospin*®). O material foi centrifugado a 1500 RPM por 10 min. Após a cito centrifugação, as lâminas foram coradas por Panótico (*Panoptic methods* / Auto-Hemacolor®) com auxílio de uma cuba de coplin. Terminada a etapa de coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada e secadas a temperatura ambiente. A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica. Cada lâmina foi observada até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100x).

3.6.1 Coleta dos órgãos para técnica histológica

Para a coleta do pulmão, os camundongos foram eutanasiados e, em seguida, no limite das costelas com o diafragma, a cavidade torácica do animal foi aberta e realizada a perfusão cardíaca. A perfusão consistia na administração de 20 mL de solução salina no coração para retirada do sangue da circulação sanguínea e a lavagem do pulmão possibilitando sua coleta. As cabeças dos animais foram coletadas após a coleta do pulmão e submetidas a uma rápida lavagem com solução salina possibilitando sua fixação.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram submetidas à fixação em formalina tamponada por no mínimo 24 h e em seguida lavadas em água corrente. A fixação garante a manutenção da integridade do tecido, evitando a sua degradação por enzimas presentes no interior das células (autólise) ou por bactérias, além de preservar a estrutura e a composição celular. Após a coleta, o material foi registrado no livro de protocolo. Por meio desse registro, o material foi identificado por um número, tipo de experimento, datas, órgãos que o acompanhou durante todos os procedimentos da técnica histológica. Cada órgão foi inserido em um cassete devidamente identificado para facilitar o manuseio durante o processo evitando possíveis trocas.

Posteriormente à fixação, o excesso de pele das cabeças foi retirado, a mandíbula inferior e os olhos foram removidos e o crânio seccionado na região posterior, entre o terceiro dente superior e a abertura posterior do ducto faríngeo (nasofaringe) (GUIBAS et al., 2014). Em seguida, os narizes foram submetidos à descalcificação química pelo auxílio de um agente quelante, o EDTA durante uma média de 15 dias. Os narizes foram suspensos no líquido descalcificador, com o volume igual ou superior a vinte vezes o volume da peça. A solução descalcificadora foi trocada diariamente e, quando possível, o frasco foi submetido à agitação. Após 10 dias foi feito o teste físico da agulha para assegurar que ocorreu a descalcificação. Uma vez obtida a completa descalcificação das amostras, elas foram lavadas para retirada do fixador e era dado prosseguimento ao processamento histológico.

3.6.2 Técnica histológica – Processamento

O material histológico foi inicialmente desidratado por imersões de 1 hora numa série crescente de álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. A desidratação evita a retração do tecido e, conseqüentemente, as lesões estruturais da célula de caráter irreversível. A imersão em álcool absoluto foi realizada duas vezes (Figura 9). O volume do solvente deve ser superior no mínimo a 10x o volume da peça (MOLINARO et al., 2010).

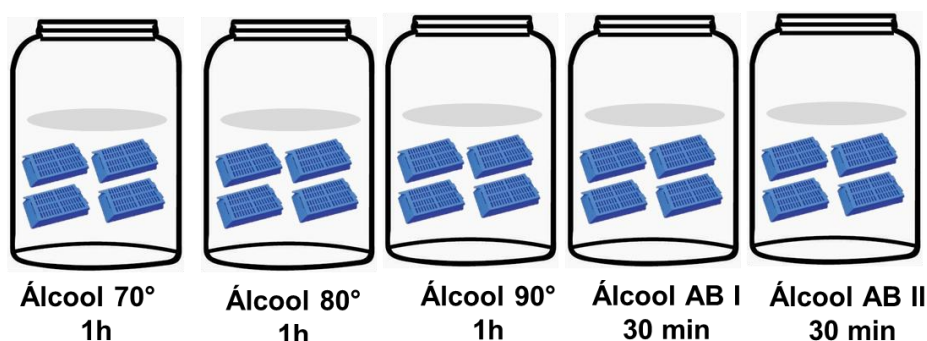


Figura 9. Processamento histológico – etapa de desidratação

Fonte: Pereira, 2017

Em seguida, foi feita a diafanização (Figura 10), na qual o material foi imerso duas vezes em xilol com duração de 1 h cada imersão. O xilol funciona nesta etapa como desalcolizante.

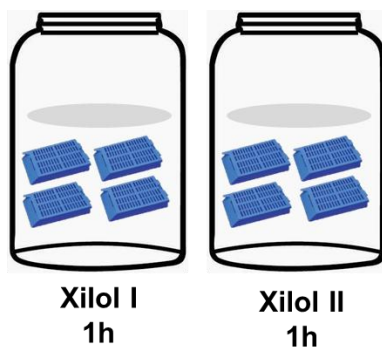


Figura 10. Processamento histológico – etapa de diafanização

Fonte: Pereira, 2017

Em sequência a diafanização, com a impregnação do material foi realizada em parafina. Na impregnação, as amostras foram submetidas a dois banhos sucessivos em parafina, cada banho com duração de 1 h.

Após impregnação, o material histológico foi emblocado em formas de parafina. Quando o material foi totalmente imerso, cada fôrma foi deixada ao ar livre para solidificação da parafina. Os blocos formados foram retirados das formas e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos no micrótomo.

Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 5 μm . Após a microtomia, as fitas de parafina obtidas foram colocadas em banho-maria (38 – 40 °C). Com auxílio das lâminas, os cortes foram “pescados” do banho-maria. Em seguida, as lâminas foram reservadas para secagem (Figura 11).



Figura 11. Processamento histológico – etapa de microtomia, pesca e secagem

Fonte: <http://www.wesapiens.org/pt/>

O corte de material biológico é basicamente transparente, devido a isso, não é possível distinguir as estruturas que o compõem ao observá-lo ao microscópio. Portanto, é necessária a etapa de coloração. Protocolos de coloração são executados por banhos sequenciais de vários corantes e reagentes. Com os cortes aderidos às lâminas, foram realizadas colorações diferentes: hematoxilina & eosina (H&E) para visualização e análise do corte histológico e da migração celular; Ácido Periódico de Schiff (PAS) para observação das células caliciformes produtoras de muco; Azul de toluidina para análise do processo alérgico mediada por mastócitos; Tricrômico de Gomori para análise de fibrose na matriz extracelular. Em seguida, era realizada a montagem das lâminas com inserção de lamínulas. Como meio de montagem (selante) era utilizado o balsamo do Canadá (VIERA, 2008).

3.6.3 Coloração Hematoxilina Eosina (H&E)

Entre todas as técnicas de coloração, a hematoxilina eosina é a mais utilizada na rotina histológica. Ela é uma coloração clássica, geral, básica e dicrômica. A hematoxilina é o corante básico que cora componentes ácidos como os núcleos de todas as células, lugar onde há alta densidade de ácidos nucleicos, exibindo, então, uma coloração que varia de azul a violeta. Já a eosina, dissolvida em etanol, é o corante ácido que se liga a componentes básicos como o citoplasma de todas as

células. No citoplasma, há grande quantidade de proteínas as quais apresentam pontes de enxofre e nitrogênio que eleva seu pH proporcionando a ligação da eosina e conferindo coloração que varia de rosa a avermelhado. A coloração H&E proporciona uma observação geral de todas as estruturas teciduais.

As lâminas foram inicialmente desparafinadas por imersão no xilol, em um banho duplicado durante 10 minutos, cada. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em álcool com concentrações decrescentes até o álcool 70°. Posteriormente, as amostras foram lavadas de forma rápida em água destilada. Então, foram imersas na hematoxilina de Harris por 30s, e mergulhadas rapidamente em água destilada até a observação do tom azul nos cortes. Em seguida, as lâminas foram colocadas no corante eosina, por 5 minutos, desidratadas com álcool a 80, 90 e 95% com duração de 2 minutos, cada imersão. Após isso, as lâminas foram colocadas na estufa por 5 minutos para secagem tornando possível sua imersão no xilol durante 10 minutos, duas vezes, a fim de clarificar o material.

Após coloração, foi realizada a selagem das lâminas para torná-las permanentes. Foi colocado sobre o corte o bálsamo do Canadá e uma lamínula. Depois, com auxílio de uma pinça, foram retiradas as bolhas e a lamínula, comprimida com firmeza sobre o corte para o espalhamento do selante. Após 24 h, foram retirados os excessos do bálsamo para acabamento e finalização do preparo das lâminas (VIEIRA, 2008).

3.6.4 Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS)

Esta técnica se baseia no uso combinado do ácido periódico junto com o reagente de Schiff. Tal combinação cora seletivamente glicogênio e mucina intracelular, observados mais frequentemente nas secreções mucoide das vias aéreas (nariz e pulmão). Observa-se um tom que varia de rosa a púrpura. Geralmente, contra corado com hematoxilina, que cora de violeta-azul os núcleos e ressalta os itens corados com o PAS.

As lâminas foram inicialmente desparafinadas por imersão no xilol, hidratadas até a água destilada, como anteriormente citado. Depois foram colocadas no ácido periódico a 0,5% por 10 min, na água destilada por 1 min e no reativo de Schiff por 25 min e água destilada por 1 min. Quando retiradas foram colocadas em 3 banhos

sulfurosos de 3 min cada e mergulhadas 1 min em água e contra corada com hematoxilina por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas com álcool 80, 90 e 95° por 2 min cada. Para clarificação era utilizado o xilol, as lâminas foram imersas no primeiro e segundo xilol por 5 min (VIEIRA, 2008).

Nas lâminas coradas pelo PAS é observado: em rosa intenso a presença de glicogênio ou polissacarídeos neutros (contendo grupos 1,2 glicol) e mucina (glicoproteína, principal constituinte do muco), os núcleos contra corados exibem um aspecto azulado e os citoplasmas se coram em rosa claro.

3.6.5 Coloração Azul de Toluidina (AT)

O AT é uma técnica monocromática que demonstra a metacromasia, fenômeno baseado em certos elementos teciduais (mastócitos), que ao serem visualizados após a sua interação com o corante, exibem uma cor distinta do corante. A coloração pelo azul de toluidina em condições ácidas específicas evidencia em magenta os grânulos dos mastócitos e os proteoglicanos da matriz cartilaginosa.

As lâminas foram desparafinadas por imersão no xilol e em seguida, hidratadas em álcool absoluto, 90%, 80%, e 70%, até a água destilada. Depois foram imersas na solução de azul de toluidina por 1 minuto e lavadas em água destilada por 1 min. A desidratação com álcool foi realizada por 80%, 90% e 95% por 2 min cada. Para clareamento foi utilizado xilol, as lâminas eram imersas no xilol I e II por 5 min cada. A selagem das lâminas foi feita com auxílio da lamínula contendo bálsamo do Canadá.

Nas lâminas coradas pelo azul de toluidina é observado em violeta os grânulos dos mastócitos. No epitélio, composto por uma camada contínua de células, é observado uma coloração mais intensa quando comparado ao tecido conjuntivo, onde as fibras e algumas células são menos ressaltadas.

3.6.7 Coloração Tricrômico de Gomori (TG)

Como seu nome indica, esta técnica se baseia na combinação de três corantes. Uma característica desta técnica é a seletividade de coloração do tecido

conectivo de forma diferencial, pois um dos corantes apresenta afinidade pelas fibras (colágeno) da matriz extracelular tecidual.

Após as etapas de desparafinização e hidratação dos cortes como descrito anteriormente, os cortes foram imersos na hematoxilina de Harris, por 1 min, mergulhadas por 10 min em água de torneira, e incubadas na mistura tricrômica, por 15 min, mergulhadas rapidamente em água acética e posteriormente em água de torneira. Foram desidratadas com dois banhos (2 min cada). Para clareamento, as lâminas foram imersas no xilol por 5 min duas vezes (VIEIRA, 2008). Após coloração foi colocado o selante sobre o corte, conforme descrito anteriormente.

Nas lâminas coradas pelo Tricrômio de gomori são observados em vermelho as fibras musculares, em azul esverdeado as fibras colágenas e em preto os núcleos.

3.7 Fotomicrografias

As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP acoplada a um microscópio óptico. As imagens eram calibradas no programa MOTIC PLUS em definições específicas conforme a objetiva utilizada: 10x ou 40x. A análise histológica foi realizada por um operador capacitado, o qual analisava qualitativamente os parâmetros histológicos para em seguida quantificá-los estatisticamente. As imagens foram analisadas ainda de forma digital pelo software Image J que analisa a quantidade de *pixels* e em seguida, gera os histogramas das áreas mensuradas previamente, comparando os grupos em questão.

3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.). A análise estatística foi feita empregando-se análise de variância (ANOVA) *one-way* e pós teste de *Tukey* utilizando o software GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. *** $p < 0,001$ foi considerado significativo quando o grupo OVA / LPS foram comparados com o grupo basal. + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ foram considerados significativos quando os grupos budesonida ou dexametasona foram comparados com o grupo OVA/LPS, respectivamente. Os

dados das análises histológicas foram analisados com o teste de *Kruskal-Wallis* e os parâmetros considerados para o cálculo da pontuação (escore histológico) foram infiltração celular, produção de muco, quantidade de fibras colágenas e número de mastócitos, conforme as colorações utilizadas (Tabela 16).

Tabela 16. Parâmetros analisados no escore histológico

Escore	Infiltrado, muco e fibras colágenas
0	Ausência de alterações histológicas
1	Grau leve: menos de 25% do campo microscópico
2	Grau moderado: de 25 a 49% do campo microscópico
3	Grau acentuado: de 50 a 75% do campo microscópico
4	Grau muito acentuado: mais de 75% do campo microscópico
Escore	Mastócitos
0	Menos de 5 células por campo
1	De 5 a 15 células por campo microscópico
2	De 16 a 25 células por campo microscópico
3	De 26 a 35 células por campo microscópico
4	Mais de 35 células por campo microscópico

Fonte: adaptado Ponikau et al., 2003

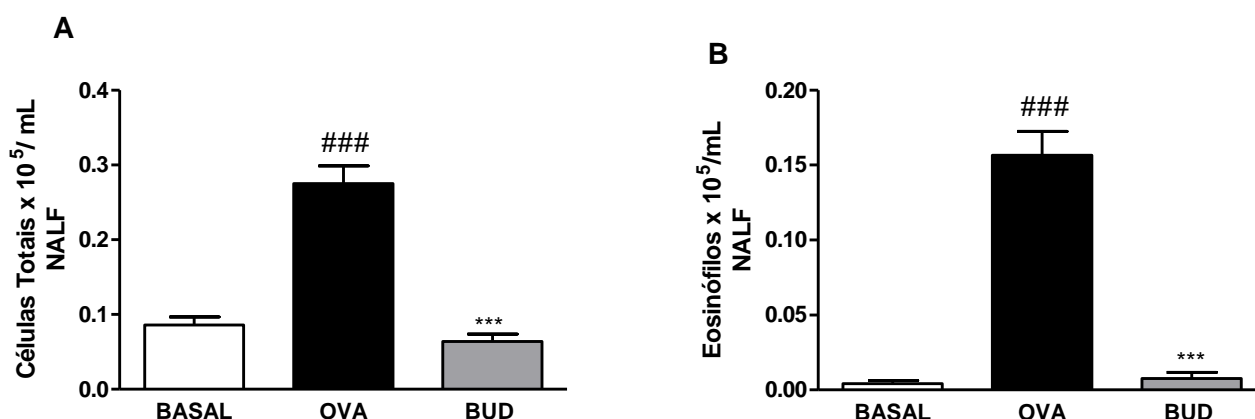
4. RESULTADOS

4.1 Perfil de migração celular para o Lavado do Fluido Nasal (NALF) após desafio alergênico de camundongos BALB / c sensibilizados com ovalbumina (OVA)

O grupo sensibilizado e desafiado com ovalbumina (OVA) apresentou migração de células do perfil alérgico para o Lavado do Fluido Nasal (NALF) com aumento de eosinófilos.

O grupo OVA ($0,27 \pm 0,02$) apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) no número de células totais no NALF quando comparado ao grupo basal ($0,08 \pm 0,01$) (Gráfico 1A). A droga padrão utilizada, budesonida ($0,9 \text{ mg / kg}$), ($0,064 \pm 0,009$) reduziu significativamente ($p < 0,001$) a quantidade de células totais em relação ao grupo OVA. Quanto ao número de eosinófilos, foi observado aumento significativo ($p < 0,01$) no grupo OVA ($0,15 \pm 0,015$) quando comparado ao grupo basal ($0,004 \pm 0,002$). O grupo budesonida diminuiu significativamente ($p < 0,001$; $0,007 \pm 0,004$) o número de eosinófilos para a cavidade nasal (Gráfico 1B).

Gráfico 1. Perfil da migração celular para o NALF após desafio alergênico com OVA em camundongos BALB / c sensibilizados com OVA



Camundongos BALB / c (n= 5) não sensibilizados (Basal), camundongos sensibilizados com OVA (ovalbumina) e não tratados (OVA) e camundongos sensibilizados com OVA e tratados com budesonida ($0,9 \text{ mg/kg}$) (BUD), droga padrão utilizada. Dados representativos de 3 experimentos. (# OVA vs. Basal) (* BUD vs. OVA) (# / * $p < 0,05$; ## / ** $p < 0,01$; ### / *** $p < 0,001$). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey (grupos vs. número de células totais (A) ou eosinófilos(B)).

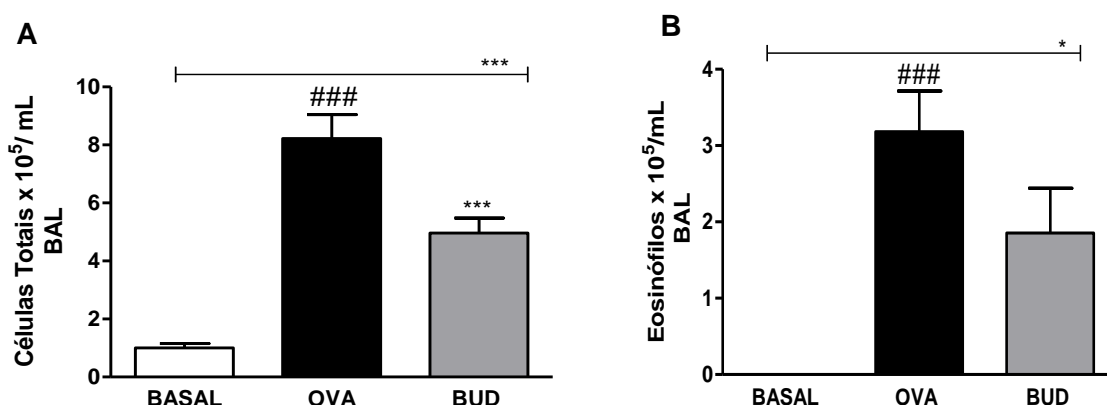
Fonte: Pereira, 2017

4.2 Perfil de migração celular para o Lavado Broncoalveolar (BAL) em camundongos BALB / c sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) em modelo experimental de Síndrome Alérgica de Rinite e Asma Combinadas (CARAS)

O grupo sensibilizado e desafiado com ovalbumina (OVA) promoveu aumento no número de células no BAL.

O número de células totais que migraram para o BAL apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) no grupo OVA ($8,22 \pm 0,82$) quando comparado ao grupo basal ($1,00 \pm 0,15$). O grupo budesonida ($0,9 \text{ mg / kg}$) (BUD) ($4,96 \pm 0,51$) reduziu significativamente ($p < 0,001$) a quantidade de células totais em relação ao grupo OVA, entretanto foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) do número de células no grupo BUD quando comparado ao Basal (Gráfico 2A). Em relação aos eosinófilos, foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) do número no grupo OVA ($3,18 \pm 0,53$) quando comparado ao grupo Basal ($0,00 \pm 0,00$). A droga padrão utilizada não diminuiu de forma significativa o número de eosinófilos para o BAL em relação ao grupo OVA (Gráfico 2B).

Gráfico 2. Perfil de migração celular no BAL de camundongos BALB / c sensibilizados e desafiados com OVA em modelo experimental de CARAS



Camundongos BALB / c ($n = 5$) não sensibilizados (Basal), camundongos sensibilizados com OVA (ovalbumina) e não tratados (OVA) e camundongos sensibilizados com OVA e tratados com budesonida ($0,9 \text{ mg/kg}$) (BUD), droga padrão utilizada. Dados representativos de 3 experimentos. (# OVA vs. Basal) (* BUD vs. Basal / OVA) (# / * $p < 0,05$; ## / ** $p < 0,01$; ### / *** $p < 0,001$). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey (grupos vs. número de células totais (A) ou eosinófilos (B)).

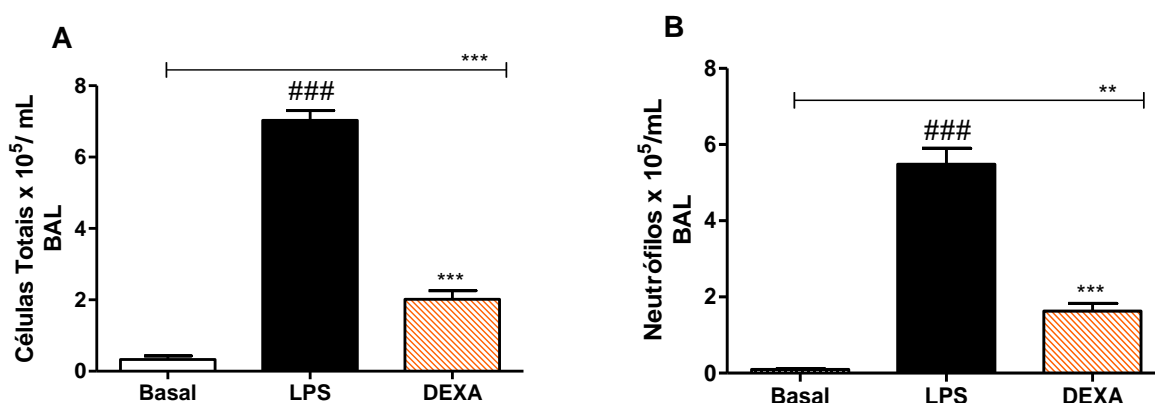
Fonte: Pereira, 2017

4.3 Perfil de migração celular para o Lavado Broncoalveolar (BAL) de camundongos BALB / c após desafio com lipopolissacarídeo (LPS) em modelo experimental de Lesão Pulmonar Aguda (LPA)

O grupo desafiado com solução de lipopolissacarídeo (LPS) apresentou aumento da migração de células do perfil inflamatório para o Lavado Broncoalveolar (BAL) com aumento de neutrófilos.

O grupo LPS apresentou aumento do número de células totais de forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$) ($7,03 \pm 0,26$) quando comparado ao grupo Basal ($0,32 \pm 0,10$) (Gráfico 3A). O número de neutrófilos no BAL aumentou significativamente ($p < 0,001$) no grupo LPS ($5,48 \pm 0,41$) quando comparado ao grupo basal ($0,09 \pm 0,02$) (Gráfico 3B). O grupo da droga padrão dexametasona (20 mg / kg) diminuiu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$) tanto o número de células totais ($2,01 \pm 0,24$) quanto o número de neutrófilos ($1,63 \pm 0,19$) quando comparado ao grupo LPS ($7,03 \pm 0,26$) ($5,48 \pm 0,41$), respectivamente. O grupo dexametasona apresentou diferença estatística no número de células totais ($p < 0,001$; $2,01 \pm 0,24$) e de neutrófilos ($p < 0,01$; $1,63 \pm 0,19$) em relação ao grupo basal ($0,32 \pm 0,10$; $0,09 \pm 0,02$) de cada contagem, respectivamente.

Gráfico 3. Perfil de migração celular para o BAL em camundongos BALB / c desafiados com LPS em modelo experimental de LPA



Camundongos BALB / c (n= 5) não desafiados (Basal), desafiados e não tratados (LPS) e desafiados e tratados via intraperitoneal (IP) com dexametasona (2,0 mg / kg) (DEXA), droga padrão utilizada. (# LPS vs. Basal) (* DEXA vs. Basal / LPS) (#/* $p < 0,05$; ###/* $p < 0,01$; ###/* $p < 0,001$). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey (grupos vs. número de células totais (A) ou neutrófilos (B)).

Fonte: Leite, 2016

4.4 Implantação e padronização de colorações

4.3 Coloração Hematoxilina Eosina (H&E) em cortes histológicos de pulmão

Na padronização do protocolo foram realizados testes nos tempos de imersão do material analisado. A variação nos tempos de coloração demonstrou a diferença na intensidade da cor dos cortes histológicos (Figura 12). Quando as lâminas foram imersas na hematoxilina e na eosina em tempos iguais, uma intensa coloração da hematoxilina foi observada nos núcleos basófilos das células bronquiolares (Figura 12 A). Com o intuito de aumentar a intensidade de cor da eosina no citoplasma, um novo corante foi preparado e acrescentado de ácido acético, o qual potencializou a coloração. Uma exacerbada tonalidade citoplasmática ocorreu em decorrência do novo preparo do corante eosina, a qual corou demasiadamente os componentes acidófilos citoplasmáticos (Figura 12 B). Finalmente, a coloração H&E foi padronizada, as lâminas permaneceram na hematoxilina por 30s e na eosina por 5 min. Na visualização das lâminas é possível observar em azul escuro os núcleos, em rosa os citoplasmas das células (Figura 12 C).

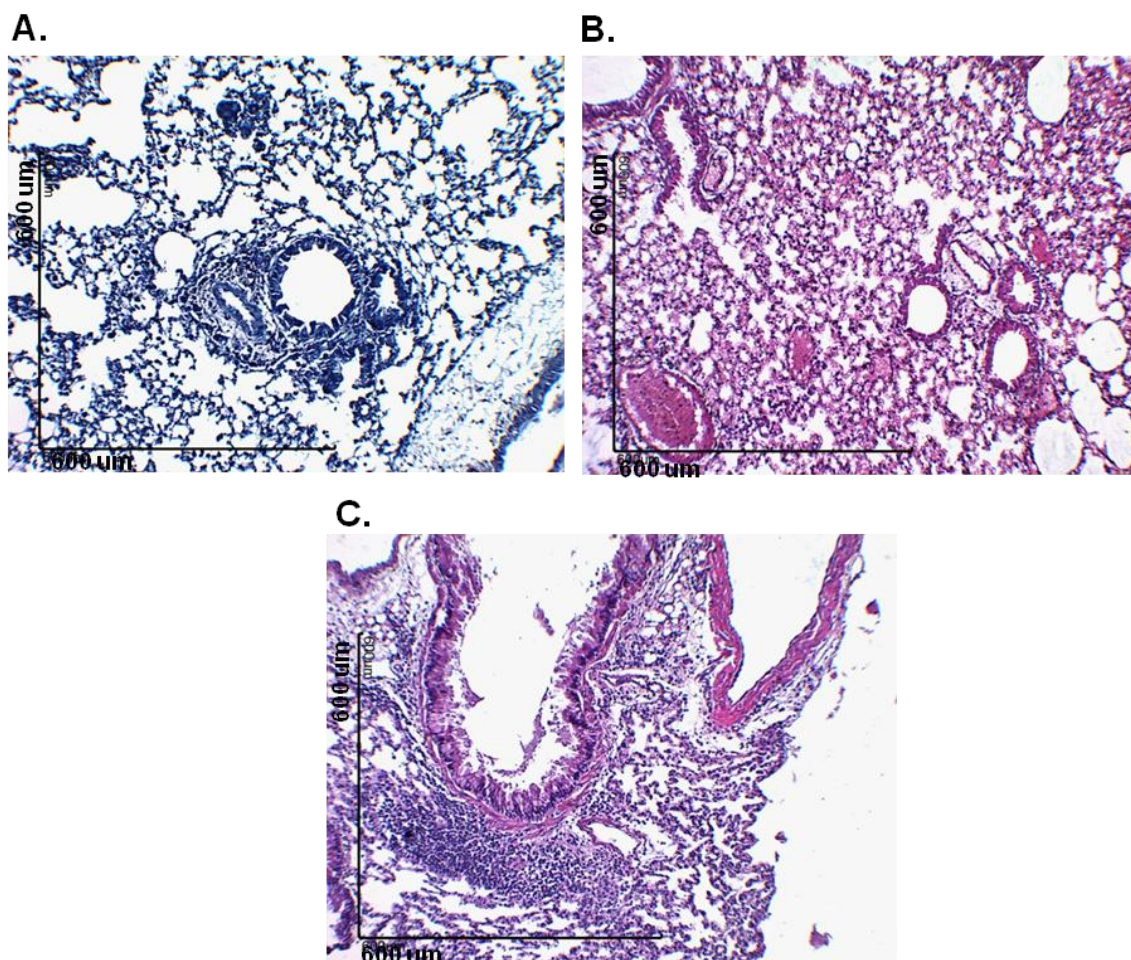


Figura 12. Fotomicrografias representativas da padronização da coloração Hematoxilina - eosina (H&E) em cortes de pulmão de camundongos BALB / c: diferença de tonalidade conforme a variação dos tempos de imersão. (A) Tempos equivalentes na hematoxilina (30s) e eosina (5min) (B) Acréscimo do ácido acético ao corante eosina. (C) Coloração H&E padronizada. Lâminas observadas em objetiva de 10x, A.T. 100x, 600 µm.

Fonte: Pereira, 2017

4.4. Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) em cortes da cavidade nasal

Na etapa de hidratação, o tempo do primeiro álcool precisou ser ajustado. As lâminas com os cortes da cavidade nasal permaneceram por mais 5 minutos no álcool absoluto, além do tempo padronizado, favorecendo assim, a hidratação da amostra e facilitando a ação posterior do ácido periódico. Uma melhora na coloração foi observada e as lâminas foram previamente levadas à estufa para secagem dos cortes histológicos a fim de facilitar a retirada da parafina (Figura 13).

Na padronização da coloração, antes dos ajustes a tonalidade da coloração entre os componentes do muco e o citoplasma se apresentava desequilibrada sem

um contraste evidente (Figura 13 A). Após os ajustes, foi observado em um tom rosa escuro o glicogênio e mucina, já em rosa claro são observados os citoplasmas (Figura 13 B).

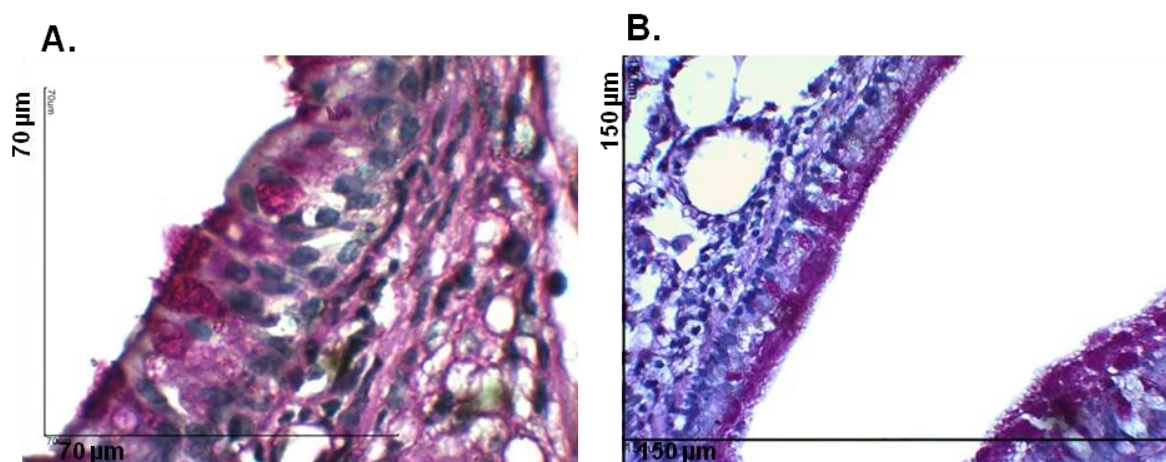


Figura 13. Fotomicrografias representativas da padronização da coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) em cortes de tecido das vias aéreas superiores de camundongos BALB / c: diferença da coloração antes (A) e após os ajustes (B). Lâminas observadas em objetiva de 40x, A.T. 400x, 150 µm. 100x, A.T. 1000x, 70 µm.

Fonte: Pereira, 2017

4.5 Coloração Azul de Toluidina (AT) em cortes da cavidade nasal

Na padronização da coloração por Azul de Toluidina (AT) os tempos de imersão no próprio corante precisaram ser ajustados (Figura 14). No corte de tecidos das vias aéreas superiores corado pela solução de AT durante em média 30 segundos foi observada baixa qualidade na marcação dos mastócitos presentes no tecido conjuntivo adjacente pouco ressaltado (Figura 14 A). Após o aumento do tempo de imersão de 1 min em uma nova solução, foram obtidos resultados satisfatórios. Há a coloração do epitélio respiratório, da cartilagem e, principalmente, mastócitos epiteliais após a metacromasia (Figura 14 B).

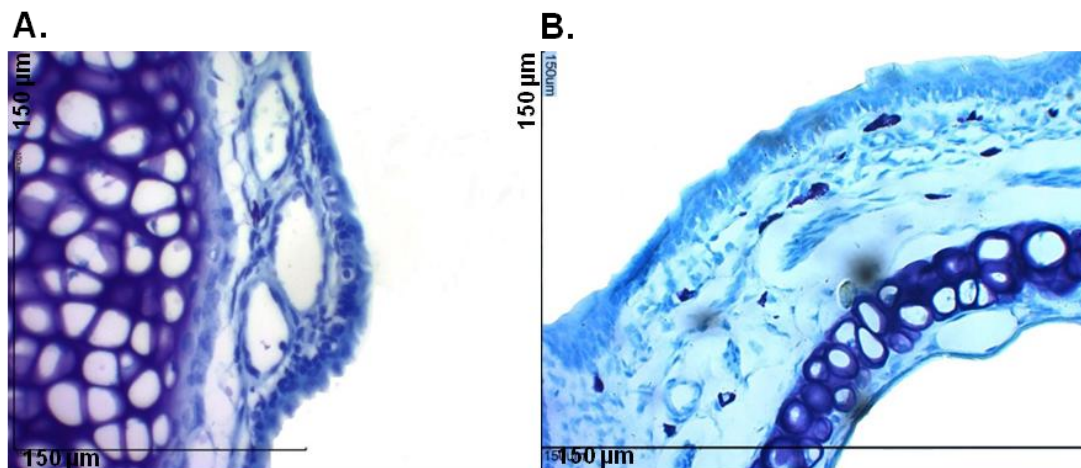


Figura 14. Fotomicrografias representativas da padronização da coloração Azul de Toluidina (AT) em cortes da cavidade nasal de camundongos BALB / c: diferença da coloração antes (A) e após os ajustes (B). Lâminas observadas em objetiva de 40x, A.T. 400x, 150 µm.

Fonte: Pereira, 2017

4.6 Coloração Tricrômica de Gomori (TG) em cortes da cavidade nasal

As primeiras lâminas com tecidos oriundos da cavidade nasal e coradas com Tricromo de Gomori (TG) apresentaram coloração escurecida, pouco atendendo aos princípios da tríade da coloração (Figura 15 A). O tempo de permanência dos cortes na mistura tricrômica foi aumentado 5 min e a permanência na solução de ácido acética foi diminuída 1 min promovendo assim uma coloração satisfatória (Figura 15 B).

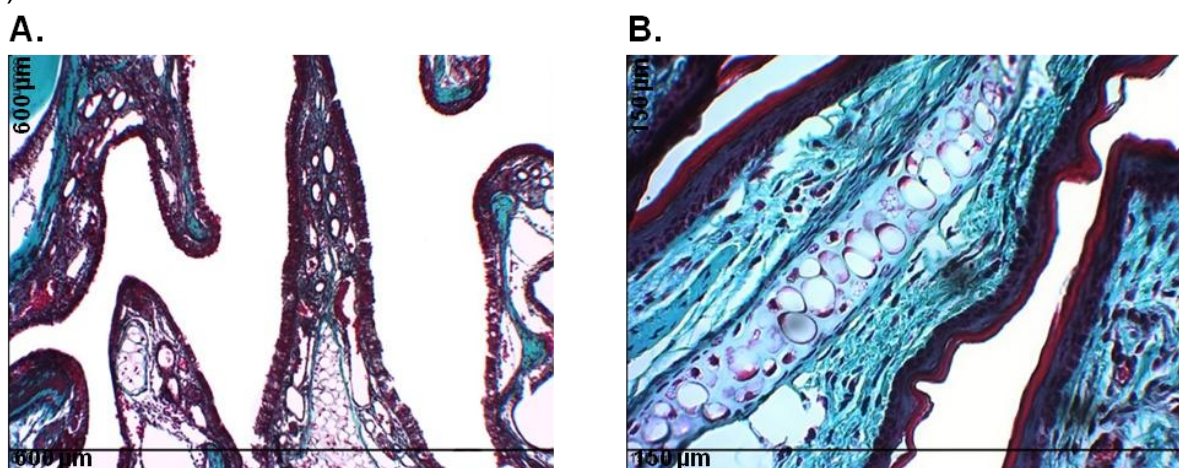


Figura 15. Fotomicrografias representativas da padronização da coloração Tricrômica de Gomori (TG) em cortes de tecido da cavidade nasal de camundongos BALB / c: diferença da coloração antes (A) e após os ajustes (B). Lâminas observadas em objetiva de 10x, A.T. 100x, 600 µm ou 40x, A.T. 400x, 150 µm.

Fonte: Pereira, 2017

4.7 Análise histológica da cavidade nasal de camundongos após protocolo experimental de Síndrome Alérgica de Rinite e Asma Cominadas (CARAS)

A análise histológica do tecido nasal de camundongos pela coloração Hematoxilina Eosina (H&E) permitiu avaliar aspectos morfológicos como estrutura dos vasos sanguíneos, migração celular e integridade do tecido.

Em objetiva de 10x o grupo OVA apresentou alterações histológicas como congestão por infiltrado celular (triângulo vermelho) nas regiões perivascular e subepitelial caracterizando o processo inflamatório quando comparado ao grupo basal (Figura 16 – H&E). No entanto, o grupo budesonida (0,9 mg / kg) (BUD), droga padrão utilizada, mostrou diminuição significativa ($p < 0,05$; $2,00 \pm 0,31$) do infiltrado celular nas regiões perivascular em comparação com os tecidos nasais do grupo OVA ($3,40 \pm 0,31$) (Gráfico 4).

A avaliação histológica pelo Ácido Periódico de Shiff (PAS) é útil para observação da presença de mucopolissacarídeos nas células do epitélio. O grupo OVA demonstrou hipertrofia e hiperplasia das células produtoras de muco pela presença de mucopolissacarídeos produzidos pelas glândulas exócrinas unicelulares (células caliciformes) do epitélio (asterisco amarelo) em comparação ao grupo Basal (Figura 16 - PAS). No entanto, o tratamento via intranasal com budesonida (0,9 mg / kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$; $2,60 \pm 0,24$) a quantidade de muco na cavidade nasal quando comparado com o grupo OVA ($3,60 \pm 0,24$) (Gráfico 4).

A coloração com Azul de Toluidina (AT) proporciona marcação de mastócitos por metacromasia possibilitando sua visualização na análise histológica. O grupo OVA ($3,20 \pm 0,37$) apresentou aumento de mastócitos (seta preta) em secções de tecido nasal em comparação com o grupo basal (Figura 16 - AT). No entanto, o tratamento com budesonida diminuiu significativamente ($p < 0,01$; $1,40 \pm 0,24$) o número de mastócitos em comparação com o grupo OVA ($3,20 \pm 0,37$) (Gráfico 4).

Com a coloração Tricrômica de Gomori (TG) a avaliação estrutural é realizada para observação dos componentes da matriz extracelular como o colágeno. As lâminas do grupo OVA coradas por tricrômio demonstraram aumento da quantidade de fibras colágenas na região perivascular subepitelial em comparação com a quantidade de fibras dos animais do grupo Basal (círculo vermelho). O grupo da

droga padrão budesonida (0,9 mg / kg) (BUD) ($1,80 \pm 0,20$) apresentou uma sutil redução na quantidade de fibras colágenas em comparação com o grupo OVA ($2,40 \pm 0,40$), entretanto, estatisticamente não significativa (Figura 16 - TG).

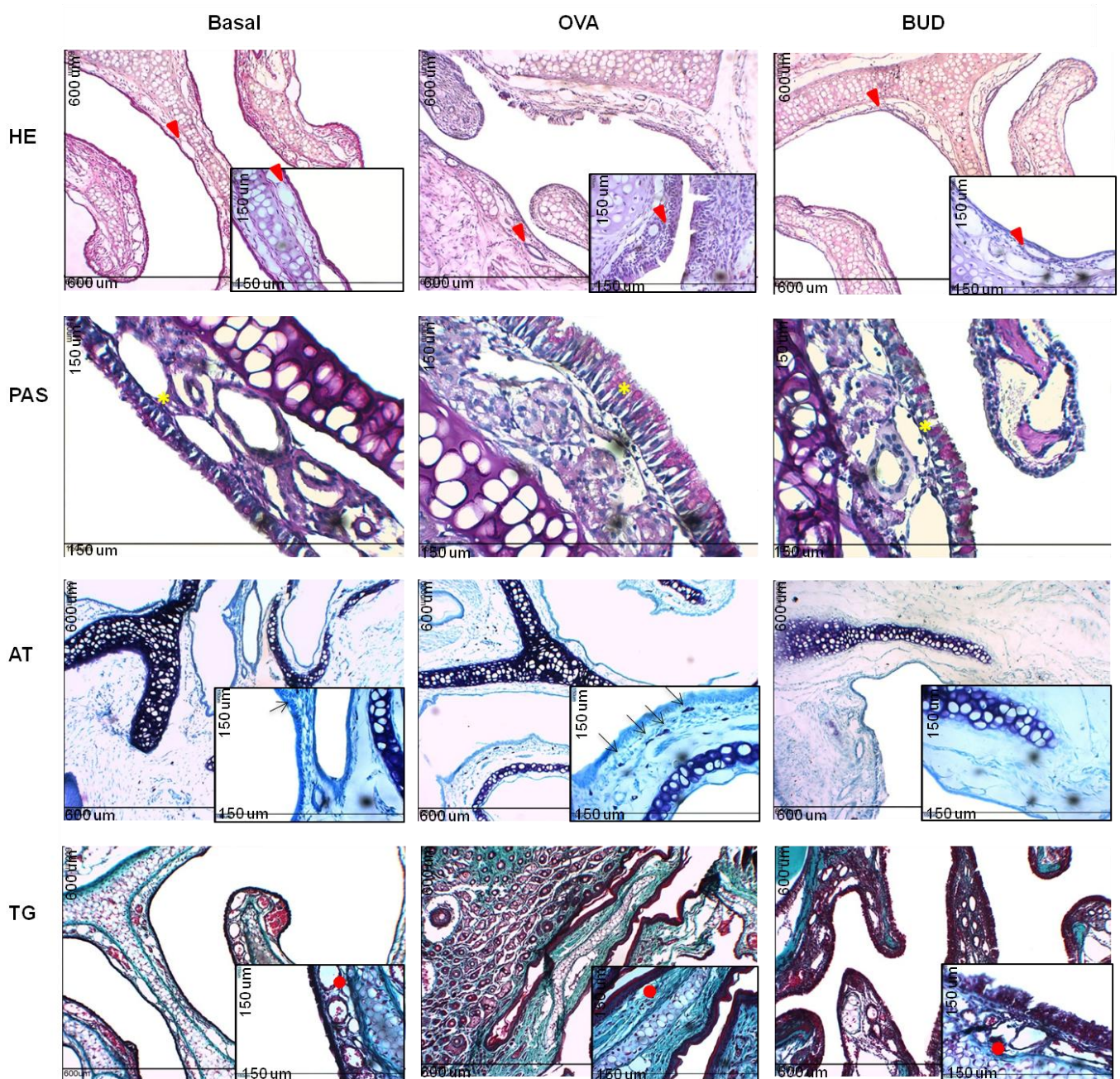


Figura 16. Fotomicrografias representativas da cavidade nasal de camundongos. Grupo Basal, OVA e BUD. Coradas por Hematoxilina Eosina (H&E), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Azul de Toluidina (AT) e Tricromo de Gomori (TG). A.T 100x (600 µm) e 400x (150 µm). ▲ = infiltração perivascular, * = células caliciformes produtoras de muco, ↘ mastócitos epiteliais, ● = fibras colágenas.

Fonte: Pereira, 2017

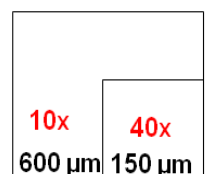
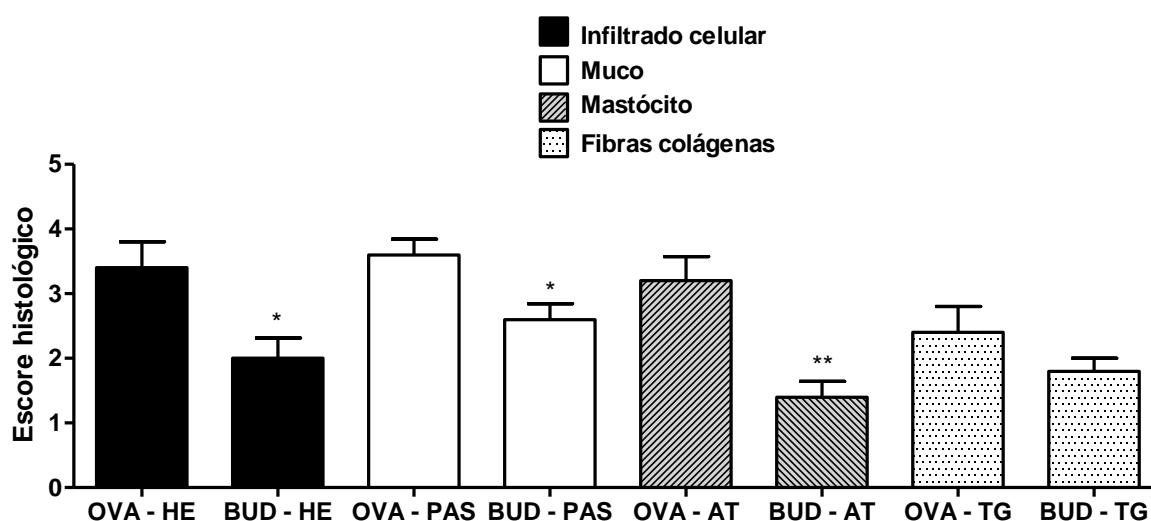


Gráfico 4. Escore qualitativo das alterações morfológicas na cavidade nasal dos animais com doenças alérgicas das vias aéreas



Camundongos (n= 5) sensibilizados com ovalbumina e não tratados (OVA) e sensibilizados com OVA e tratados com budesonida (0.9 mg / kg) (BUD), droga padrão utilizada. Dados representativos de 3 experimentos. (* BUD vs. OVA) ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). ANOVA “one-way” seguido do teste de *Kruskal-Wallis* (parâmetro histológico vs. escore).

Fonte:

Pereira,

2017

O programa Image J permitiu diferenciar as fotomicrografias dos grupos corados em H&E. A quantidade de *pixels* no grupo OVA (3.480) foi quase o dobro do grupo basal (1.974). A quantidade de *pixels* do grupo BUD (1599) foi intermediária (Figura 17).

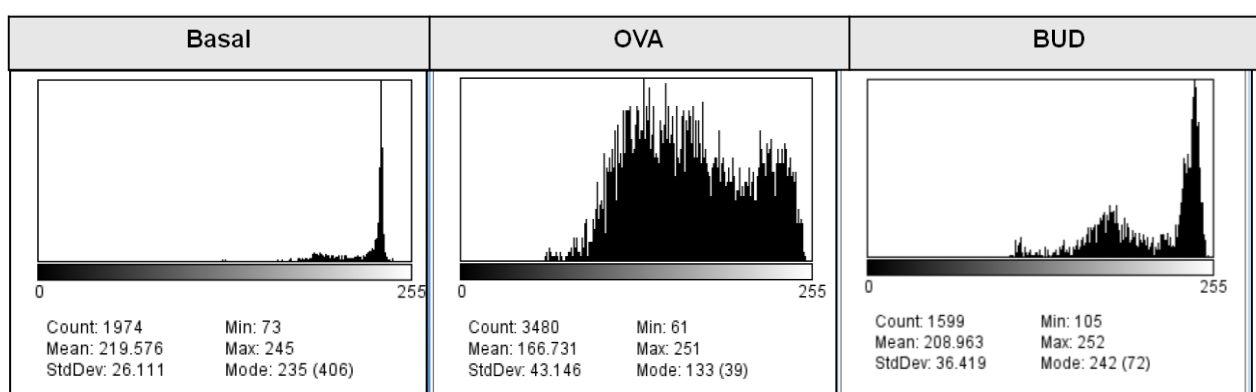


Figura 17. Histogramas da quantidade de *pixels* mensurados nas lâminas da cavidade nasal de camundongos BALB / c com doença alérgica das vias aéreas, do grupo Basal, OVA e BUD. Coradas em H&E, A.T 400x (150 μ m). Área mensurada 300x240 *pixels*; RGB (Red, Green, Blue); 21k.

Fonte: Pereira, 2017

4.8 Análise histológica do pulmão de camundongos após protocolo experimental de Síndrome Alérgica de Rinite e Asma Cominadas (CARAS)

A coloração com Hematoxilina Eosina (H&E) possibilitou a observação da migração de células para a cavidade pulmonar, a estrutura morfológica dos vasos sanguíneos, bronquíolos e alvéolos pulmonares. O grupo OVA ($3,80 \pm 0,20$) apresentou aumento da migração na região perivascular e peribronquiolar em relação ao grupo basal (triângulo vermelho) (Figura 18 – H&E). No entanto, o grupo budesonida (0,9 mg / kg) BUD ($2,40 \pm 0,24$) mostrou diminuição significativa ($p < 0,05$) da infiltração celular nas regiões perivascular e peribronquiolar quando comparado ao grupo OVA ($3,80 \pm 0,20$) (Gráfico 5).

A técnica do Ácido Periódico de Schiff (PAS) permitiu observar a funcionalidade das células produtoras de muco frente ao modelo alérgico adotado. As lâminas do grupo OVA ($3,60 \pm 0,24$) evidenciaram a hipertrofia e a hiperplasia das células caliciformes no epitélio (asterisco amarelo) em comparação com os animais do grupo basal (Figura 18 - PAS). O tratamento por via intranasal com budesonida (0,9 mg / kg) ($p < 0,05$; $2,40 \pm 0,40$) diminuiu a produção de muco no epitélio pulmonar quando comparado ao grupo OVA ($3,60 \pm 0,24$) (Gráfico 5).

A coloração por Azul de Toluidina (AT) demonstrou uma quantidade pouco superior de mastócitos (seta preta) em secções de tecido pulmonar de animais do grupo OVA ($1,40 \pm 0,40$) comparados ao grupo Basal (Figura 18 - AT). O tratamento com budesonida ($1,20 \pm 0,37$) não apresentou diferença estatística do grupo OVA ($1,40 \pm 0,40$) (Gráfico 5).

As lâminas dos animais do grupo OVA coradas com Tricromo de Gomori (TG) apresentaram aumento da quantidade de fibras colágenas na região perivascular quando comparado a quantidade de fibras (círculo vermelho) nos animais do grupo basal (Figura 18 - TG). A budesonida, droga padrão utilizada, ($1,60 \pm 0,24$) reduziu a quantidade de fibras colágenas em comparação com o grupo OVA ($2,40 \pm 0,24$), entretanto, sem diferença estatística (Gráfico 5).

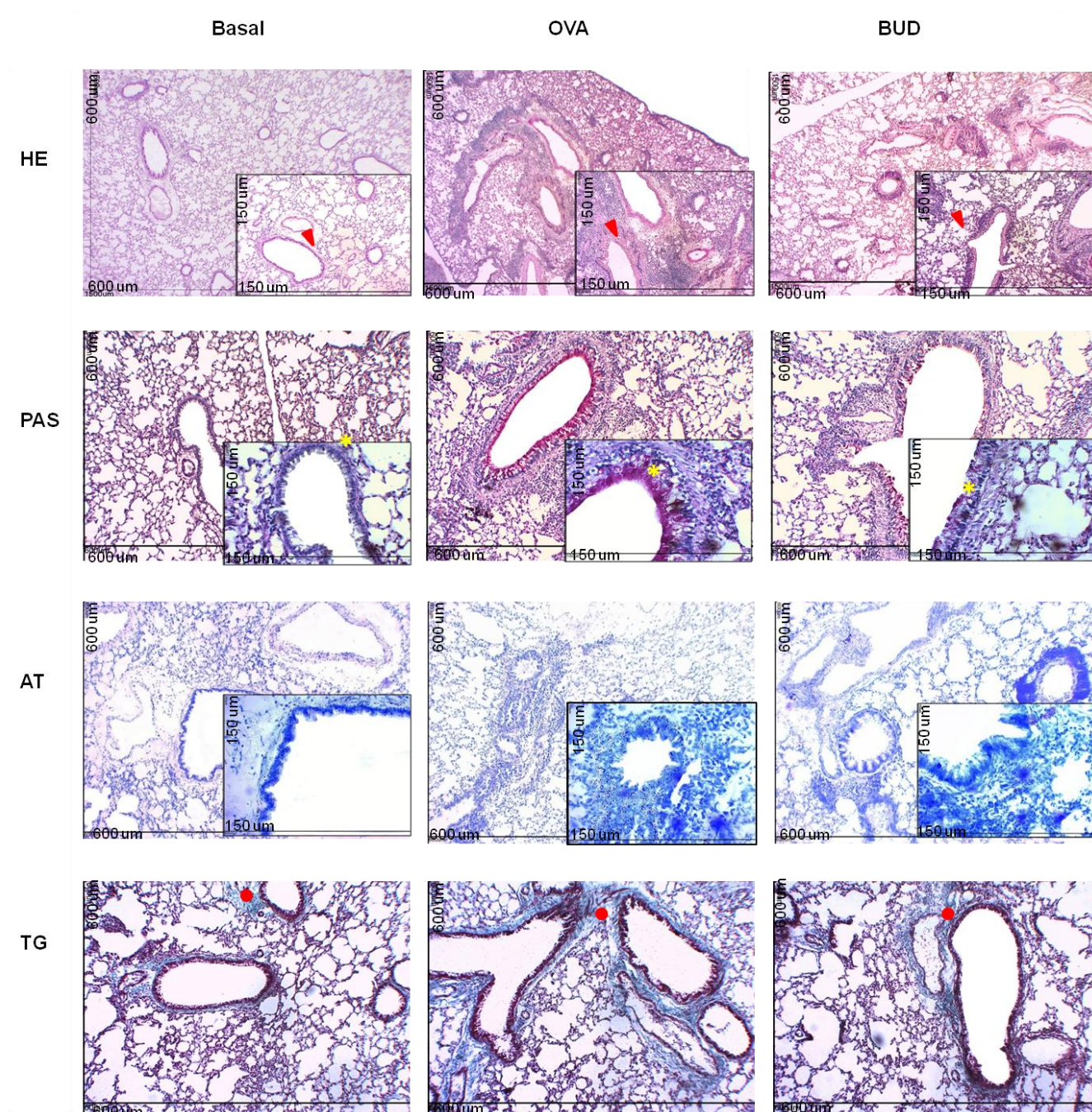
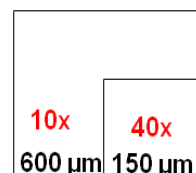
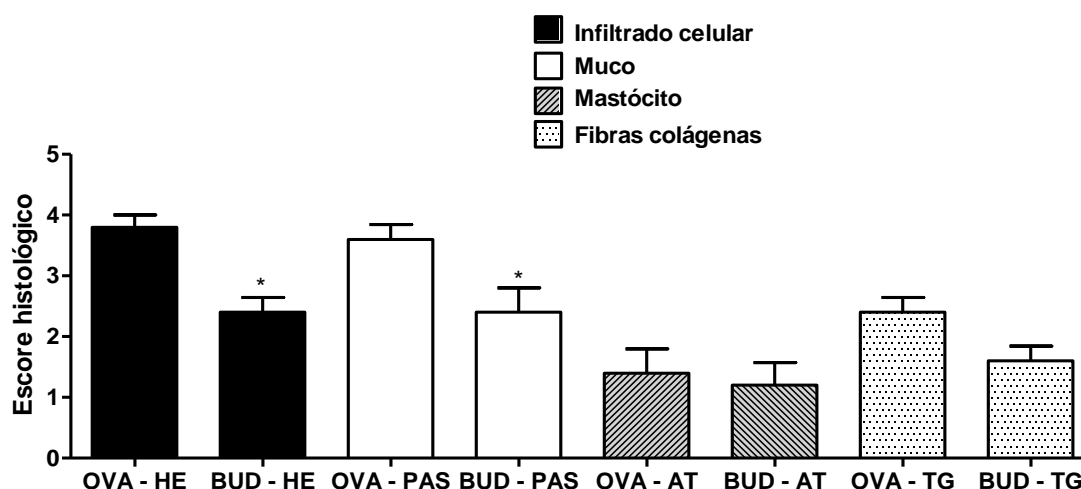


Figura 18. Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos. Grupo Basal, OVA e BUD. Coradas por Hematoxilina Eosina (H&E), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Azul de Toluidina (AT) e Tricromo de Gomori (TG) A.T 100x (600 μ m) e 400x (150 μ m). \blacktriangle = infiltração perivascular, \star = células caliciformes produtoras de muco, \searrow mastócitos epiteliais, \bullet = fibras colágenas.



Fonte: Pereira, 2017

Gráfico 5. Escore qualitativo das alterações morfológicas na cavidade pulmonar dos animais com doenças alérgicas das vias aéreas.



Camundongos (n= 5) sensibilizados com ovalbumina e não tratados (OVA) e sensibilizados com OVA e tratados com budesonida (0.9 mg / kg) (BUD), droga padrão utilizada. Dados representativos de 3 experimentos. (* BUD vs. OVA) ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). ANOVA “one-way” seguido do teste de *Kruskal-Wallis* (parâmetro histológico vs. escore).
Fonte: Pereira, 2017

A quantidade de *pixels* no grupo OVA (4.118) foi quase o dobro do grupo basal (2.295). A quantidade do grupo BUD (2.236) foi intermediária (Figura 19).

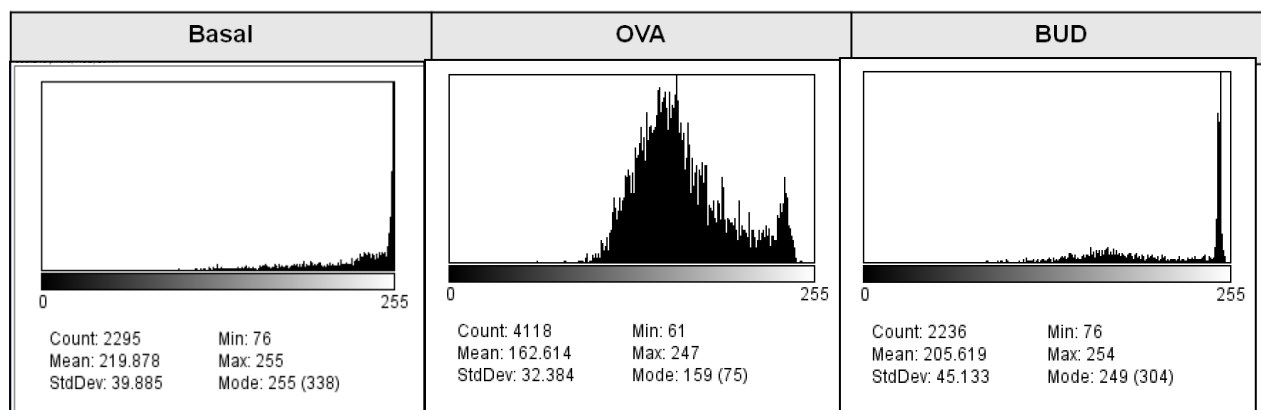


Figura 19. Histogramas da quantidade de *pixels* mensurados no tecido pulmonar de camundongos BALB / c com doença alérgica das vias aéreas, do grupo Basal, OVA e BUD. Coradas em H&E, A.T 400x (150 μ m). Área mensurada 300x240 *pixels*; RGB (Red, Green, Blue); 21k.

Fonte: Pereira, 2017

4.9 Análise histológica do pulmão de camundongos após protocolo experimental de Lesão Pulmonar Aguda (LPA)

A análise histológica do tecido pulmonar de camundongos BALB / c com Lesão Pulmonar Aguda (LPA) corados em Hematoxilina Eosina H&E permitiu avaliar aspectos morfológicos como infiltrado celular, edema e hemorragia.

A análise histológica em H&E do grupo LPS demonstrou intenso infiltrado de células polimorfonucleares edema intersticial e hemorragia quando comparado ao grupo Basal (Figura 20). Em um maior aumento (40x) foi observado que o grupo basal apresenta aspecto histológico normal e histoarquitetura pulmonar preservada. Já o grupo LPS apresentou dano alveolar difuso com aumento da permeabilidade da membrana alveolar observada pela presença de inflamação intersticial, edema pulmonar com presença de membranas hialinas e espessamento da parede alveolar promovendo o colapso alveolar. A droga padrão dexametasona (2 mg / kg) diminuiu a inflamação intersticial, com diminuição do edema e das membranas hialinas, regrediu a espessura da parede alveolar diminuindo o dano e consequentemente o colapso alveolar (Figura 20).

No escore histológico, o grupo dexametasona reduziu significativamente o infiltrado de células ($p < 0,05$; $2,00 \pm 0,31$), o edema ($p < 0,05$; $1,60 \pm 0,24$) e a hemorragia ($p < 0,05$; $1,40 \pm 0,24$), em comparação ao número de células ($3,60 \pm 0,24$), edema ($3,20 \pm 0,37$) e hemorragia ($3,00 \pm 0,31$) do grupo LPS (Gráfico 6).

O grupo LPS ($2,40 \pm 0,24$) demonstrou aumento significativo ($p < 0,05$) da quantidade de fibras colágenas quando comparado ao grupo basal (Figura 20). O grupo dexametasona ($1,00 \pm 0,31$) reduziu a quantidade de fibras em relação ao grupo LPS (Gráfico 6).

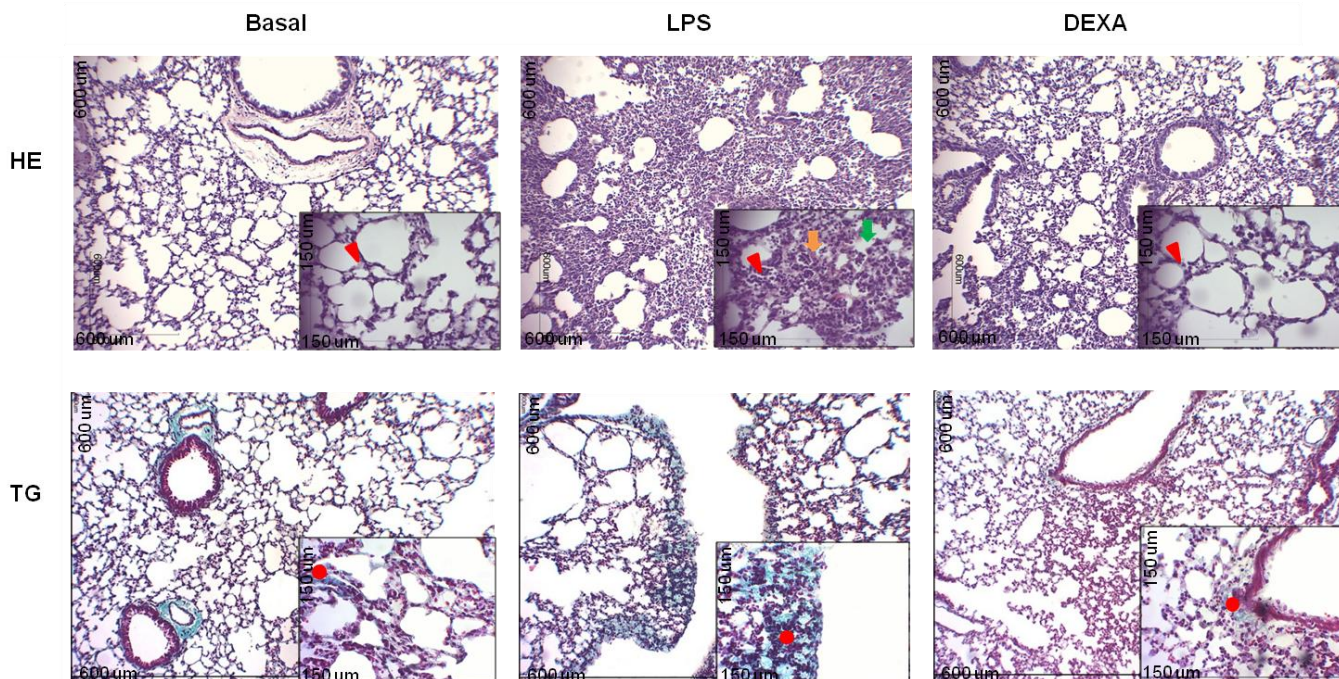


Figura 20. Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos. com LPA . Grupo Basal, LPS e DEXA. Coradas por Hematoxilina Eosina (H&E) e Tricromo de Gomori (TG). A.T 100x (600 µm) e 400x (150 µm). ▲ = infiltração perivascular, ▼ = edema, ⇩ = hemorragia, ● = fibras colágenas.

Fonte: Pereira, 2017

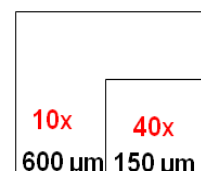
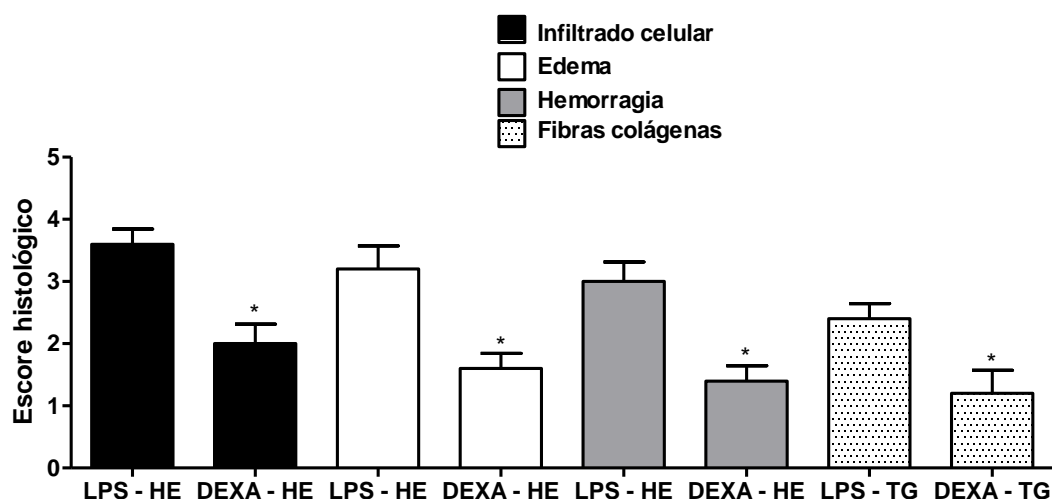


Gráfico 6. Escore qualitativo das alterações morfológicas no tecido pulmonar dos animais com LPA



Camundongos (n= 5) desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e não tratados (LPS) ou com dexametasona (2 mg / kg) (DEXA), droga padrão utilizada. Dados representativos de 3 experimentos. (* DEXA vs. LPS) ($p < 0,05$; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). ANOVA "one-way" seguido do teste de *Kruskal-Wallis* (parâmetro histológico vs. escore).

Fonte: Pereira, 2017

A quantidade de *pixels* no grupo LPS (2.450) foi quase o dobro da quantidade observada no grupo basal (2.499). A quantidade de *pixels* do grupo DEXA (2.808) foi intermediária (Figura 21).

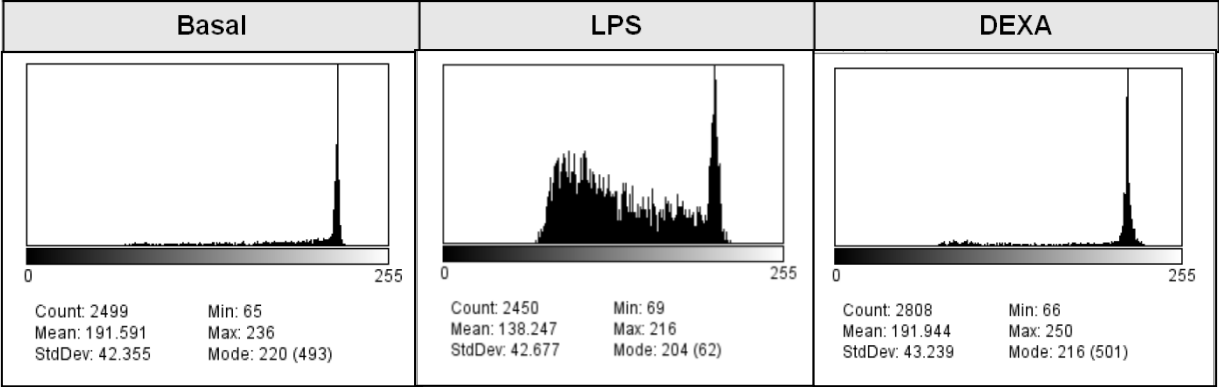


Figura 21. Histogramas da quantidade de *pixels* mensurados nas lâminas da cavidade pulmonar de camundongos BALB / c com LPA, conforme o grupo Basal, LPS e DEXA. Coradas em H&E, A.T 400x (150 μ m). Área mensurada 300x240 *pixels*; RGB (Red, Green, Blue); 21k.

Fonte: Pereira, 2017

5. DISCUSSÃO

No processo de padronização das colorações histológicas para análise das desordens respiratórias, os parâmetros quantitativos citológicos de migração para o Fluido do Lavado Nasal (NALF) e Lavado Broncoalveolar (BAL) foram determinados a partir das alterações morfológicas características da Síndrome Alérgica da Rinite e Asma combinadas (CARAS) e Lesão Pulmonar Aguda (LPA). Após implantação das técnicas histológicas, as diferenças nos parâmetros teciduais tais como migração celular, produção de muco, presença de mastócitos e produção de fibras colágenas, passaram a serem utilizados para classificação das desordens respiratórias e sua intensidade.

As doenças alérgicas respiratórias são consideradas como problema de saúde mundial resultante de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais. Doenças alérgicas respiratórias são desordens inflamatórias crônicas caracterizadas por alterações das vias aéreas, tais como produção de muco, inflamação eosinofílica, hiper-responsividade brônquica, fibrose e remodelamento de tecidos (LEE et al., 2017; TRONDE et al., 2007). Pesquisadores alergologistas ressaltam a inter-relação entre doenças alérgicas como a asma, rinite, eczema e urticária e o potencial risco de cronicidade em casos de tratamentos inadequados. A Sociedade Portuguesa de alergologia estima que em 2025, a asma será a doença crônica mais prevalente na infância e uma das maiores causas de gastos em saúde (SPAIC, 2017).

Neste trabalho, como era esperado, a análise do BAL e do NALF do grupo OVA no protocolo experimental de CARAS apresentou aumento na migração celular, mais especificamente eosinófilos. Esse recrutamento celular pode ser explicado pela indução da resposta do tipo T_H2 e ativação de células inflamatórias incluindo eosinófilos, além do aumento da produção dos níveis de IL-4, IL-13 e IL-5 (BISSET; SCHMID, 2005). A inflamação alérgica nas vias aéreas induz a degranulação dos eosinófilos e a liberação de proteases e agentes quimiotáticos mediada pelo receptor CD52 via sistema complemento (ZHANG et al., 2007). Outros trabalhos também demonstram aumento da migração específica de células da inflamação para o BAL e da produção de imunoglobulina E (IgE OVA-específica) em modelo

experimental de doenças alérgicas (VIERA et al., 2013; BEZERRA-SANTOS et al., 2006).

Estudo realizado anteriormente relatou que a eosinofilia é um sinal marcante de desordens alérgicas, correlacionando as proteínas dos grânulos de eosinófilos e mediadores de derivados lipídicos com a hiperresponsividade e danos ao tecido. Associando, assim, a diminuição dos sintomas alérgicos a redução da eosinofilia após tratamento (BEZERRA-SANTOS et al., 2006).

Nas doenças alérgicas é observado também o aumento no número de células inflamatórias entre as células epiteliais, incluindo eosinófilos, linfócitos, macrófagos e mastócitos. A análise histológica pela coloração Hematoxilina Eosina (H&E) demonstrou a instalação da inflamação pelo aumento da migração celular perivascular e peribronquiloar no pulmão e perivascular subpetelhal na cavidade nasal nos animais do grupo OVA. Em concordância a este resultado, outro estudo demonstrou, em modelo de asma alérgica, o aumento do infiltrado inflamatório no tecido (VIEIRA, 2008). O infiltrado leucocitário tecidual se repete quando se analisa a asma em conjunto com a ansiedade (MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016).

No epitélio, vem sendo estudado pela comunidade científica, o papel das células caliciformes em doenças alérgicas. A obstrução das vias aéreas pela produção excessiva de muco é uma observação comum em pacientes alérgicos, o epitélio demonstra aumento do número de células da mucosa (hiperplasia), com depósito excessivo de muco nas vias aéreas, isto é, hipertrofia em decorrência da metaplasia epitelial. Ainda no epitélio, está presente uma membrana basal mais espessa que contém vários fatores de matriz extracelular como o nidogênio, condronectina, osteonectina e a tenascina, em comparação com epitélios normais (WADSWORTH et al., 2011).

A utilização da coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) permitiu a observação, do aumento do número de células caliciformes (hiperplasia) bem como aumento da quantidade de muco por ela produzida (hipertrofia) nos animais do grupo OVA. Outra pesquisa demonstrou que a análise histológica pulmonar de camundongos asmáticos apresentou aumento da produção de muco quando os animais foram tratados com a solução de tampão fosfato (PBS) (JUNGSUWADEE, 2004).

Em termos de mecanismo de ação, a hipersecreção de muco no contexto de inflamação alérgica é um processo complexo ainda não totalmente explicado. Já foi elucidado que a metaplasia das células produtoras de muco, envolve a indução de genes de mucina como o gene *muc5ac*, armazenamento nos grânulos pré-formados, liberação dos grânulos para o interior do lúmen das vias aéreas e, alterações na viscosidade do muco. Sabe-se ainda, que o processo de produção da IL-13 no epitélio das vias aéreas exerce importância fundamental na hiper-responsividade (GOUR et al., 2015). Inicialmente, as células de clara sofrem uma transição fenotípica para células caliciformes pelas das ações de vários fatores de transcrição incluindo Spdef (ETS) e Foxa 2. A IL-13 induz a expressão do Fator de transcrição do epitélio ETS (Spdef), mediado por STAT6 (PARK et al., 2007). O fator Spdef, por sua vez, inibe a transcrição de Foxa2, que é necessário para a manutenção da diferenciação do epitélio das vias aéreas dentro da normalidade (CHEN et al., 2009). A inibição de Foxa2 acarreta a metaplasia de células caliciformes e a produção de mucinas e outros fatores necessários para função (ALEVY et al., 2012).

Recentemente foi demonstrado também que a deficiência no gene *muc5ac* cessa a hiper-responsividade das vias aéreas (AHR) em modelo alérgico experimental, apresentando uma redução de 74% na obstrução pelo muco, sugerindo que a obstrução mediada por MUC5AC das vias aéreas é uma mecanismo de indução da AHR (EVANS et al., 2015).

Outra célula efetora na resposta alérgica são os mastócitos. A resposta imune em doenças alérgicas é caracterizada pelo perfil T_H2 mediado pela imunoglobulina E (IgE). O processo alérgico é desenvolvido quando o alérgeno se liga à IgE fixada aos mastócitos teciduais ou aos basófilos circulantes, proporcionando o movimento dos grânulos intracelulares para membrana celular e consequentemente a liberação dos mediadores inflamatórios como histamina e leucotrienos, característicos das doenças alérgicas como asma, rinite, urticária e dermatite de contato (BROIDE et al., 2011).

A análise histológica por coloração com Azul de Toluidina (AT) possibilitou a observação de mastócitos no grupo OVA. A comprovação do envolvimento desta célula é fundamental para embasamento do modelo alérgico, pois, uma vez ativo, ocorrerá a liberação de histamina. A histamina é responsável por inúmeras respostas celulares, incluindo neurotransmissão, vasodilatação e aumento da

permeabilidade vascular além de estar envolvida no início das reações alérgicas e inflamatórias. Os efeitos da histamina são mediados por receptores do tipo H1, H2, H3 e H4 que são acoplados à proteína G. Os receptores H1 e H2 são responsáveis pela maioria das ações inflamatórias induzidas pela histamina (JONES; KEARNS, 2011). Na resposta alérgica, a ativação de receptores FcεRI ativam a fosfolipase C (PLC) culminando no aumento da concentração de cálcio intracelular e fusão na membrana das vesículas contendo grânulos histamínicos.

O aumento das concentrações de mediadores inflamatórios como consequência do quadro persistente está associado às alterações estruturais das vias aéreas, denominadas remodelamento das vias aéreas (MANSO et al., 2012). O remodelamento das vias aéreas inclui a perda da integridade epitelial, a fibrose subepitelial e a deposição de colágeno, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas, aumento da produção de muco e glândulas submucosas e espessamento da parede das vias aéreas (LEE et al., 2017).

Com coloração Tricrômica de Gomori (TG), foi possível evidenciar as fibras colágenas no tecido de camundongos do grupo OVA, com um sutil aumento de sua quantidade. Esse aumento, não tão evidente, pode ser justificado pela relação entre dias e cronicidade do modelo adotado. A literatura relata que a quantidade de fibras expressas se torna mais evidente a partir do quinquagésimo dia de protocolo experimental (FUCHS; BRAUN, 2008; LEE et al., 2017). Em outro estudo, utilizando a mesma coloração, os animais do grupo OVA apresentaram aumento da quantidade da matriz extracelular como o colágeno, as fibras elásticas e reticulares em protocolo de asma (VIERA, 2008).

O mecanismo do remodelamento das vias aéreas envolve interações entre várias de células, como eosinófilos, linfócitos T, mastócitos, células musculares lisas, células epiteliais e fibroblastos (GIRODET et al., 2011). As fibras colágenas, ressaltadas pela coloração TG, estão envolvidas em situações de remodelamento tecidual em modelos de desordens respiratórias (PONIKAU et al., 2003). Neste caso, quantidades elevadas de colágeno, fibronectina e tenascina-C são depositados na lâmina reticular sob o epitélio das vias aéreas (TAKAYAMA et al., 2006). Mediadores como o TGF-β podem contribuir para o remodelamento das vias áreas. Mudança nos parâmetros fibrosos via IL-13 e estimulação epitelial são importantes em situações de cronicidade. Estudo sugere que a IL-13 induz a hiper-

responsividade das vias aéreas independente da quantidade de fibras (KUPERMAN et al., 2002).

O colágeno, constituinte das fibras, é uma escleroproteína constituída de duas moléculas de tropocolágeno, que se alinham para formar a fibrila de colágeno. Várias fibrilas unidas formam uma fibra colágena e várias fibras formam um feixe de fibras colágenas. Existem vários tipos de colágenos, o colágeno tipo 3 constitui as fibras reticulares e colágeno tipo 4 o qual aparece na lâmina basal, um dos componentes da membrana basal dos epitélios amplamente analisado nas desordens respiratórias (JUNQUEIRA; CANEIRO, 2008).

Outro exemplo de desordem respiratória é a Lesão Pulmonar Aguda (LPA). A LPA é uma condição inflamatória na qual observamos os principais processos e agentes da inflamação aguda, como o influxo de células inflamatórias, aumento da permeabilidade alveolocapilar com formação de edema pulmonar rico em proteínas e fatores pró-inflamatórios (GROENEVELD, 2003; LEIKAUF et al., 2002).

A LPA se desenvolve a partir da alteração de células epiteliais e endoteliais do pulmão e do influxo de células inflamatórias para o tecido resultando na interrupção da produção do surfactante, uma mistura lipoproteica com propriedades tensoativas presente no edema pulmonar e na atelectasia, um colapso do parênquima pulmonar. Vários modelos animais para LPA têm sido desenvolvidos via a indução com lipopolissacarídeo (LPS), hipóxia, embolia, e ácido oléico (LEIKAUF et al., 2002). A utilização de LPS na indução da LPA é o segundo modelo com maior número de citações no banco de dados do PubMed no período de 5 anos (MATUTEBELLO, 2008).

O aumento do número de células totais no BAL de camundongos com LPA foi observado no grupo LPS. Dentre as células que migraram, os neutrófilos obtiveram destaque. Os neutrófilos desempenham um papel central na patogênese da LPA, combinado com uma variedade de mediadores, incluindo citocinas (TNF- α , IL-1 β), PAF, espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO) e fatores de crescimento. Macrófagos ativados, por exemplo, liberam uma variedade de citocinas, ERO, NO e enzimas proteolíticas (LEIKAUF et al., 2002; SILLIMAN et al., 1998). Os distúrbios que levam ao desenvolvimento da LPA afetam pacientes de todas as idades, com taxas de mortalidade substanciais, em torno de 30-50%. E

apesar das sofisticadas terapias intensivas baseadas em evitar as complicações e tratar a causa subjacente, a LPA não tem tratamento específico (RAGHAVENDRAN et al., 2008; WHEELER; BERNARD, 2007).

O tratamento de animais com DEXA que apresentavam a LPA inibiu a migração de leucócitos totais e neutrófilos no BAL corroborando aos resultados obtidos anteriormente em modelo experimental de LPA que analisava a atividade anti-inflamatória de substâncias naturais e sintéticas bioativas. (LEITE, 2016; OLIVEIRA, 2014).

Na LPA, o recrutamento neutrofílico pode ser justificado pela ação de mediadores e aumento da permeabilidade vascular (SHAH et al., 2014). O infiltrado leucocitário para o tecido pulmonar e a destruição do tecido local está atrelado à ação das citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 que desempenham um papel crucial na patogênese da doença. Além disso, outros estudos ressaltam o envolvimento de fatores quimiotáticos contribuindo para o recrutamento de neutrófilos para o pulmão como a quimiocina de queratinócitos (KC) e CXCL5 (SHAH et al., 2014).

Na análise histológica dos pulmões do grupo LPS, corados em TG, foi demonstrado um aumento da quantidade de fibras colágenas. A contradição desses resultados nos diferentes modelos experimentais deve-se provavelmente a severidade da doença LPA e também ao tempo de duração do modelo experimental utilizado de doença diretamente relacionado à cronicidade (OLIVEIRA, 2014).

A evidência da importância que este trabalho tem para sociedade, como retorno do investimento dado a ele, é comprovada quando a utilidade das técnicas histológicas é ressaltada pela literatura acadêmica, epidemiológica, científica e hospitalar. Além disso, desordens respiratórias estão compondo o ranking das principais causas da procura pela atenção primária e, principalmente, acometimento diário da qualidade de vida de quem as possuem.

Portanto, esse trabalho deteve-se a implantar as técnicas histológicas a partir de órgãos coletados de animais que apresentavam doenças alérgicas das vias aéreas ou LPA e os resultados apresentados fornecem subsídios para que próximos modelos, desenvolvidos no nosso laboratório, e substâncias em testes, possam ser analisados histologicamente a partir das técnicas implantadas e padronizadas.

6. CONCLUSÕES

O modelo experimental de doenças alérgicas das vias aéreas demonstrou:

- ✓ Aumento do recrutamento de células totais e eosinófilos para o BAL e NALF;
- ✓ A coloração H&E demonstrou o infiltrado leucocitário tanto nos pulmões, na região perivascular e peribronquiolar, quanto na cavidade nasal, na região perivascular e subepital;
- ✓ A coloração de PAS evidenciou a hiperplasia e hipertrofia das células produtoras de muco no epitélio pseudoestratificado nasal e no epitélio bronquiolar;
- ✓ Marcação dos mastócitos pela coloração Azul de Toluidina (AT);
- ✓ A coloração TG evidenciou o efeito do quadro alérgico sobre células epiteliais sugerindo interferência na produção de fibronectina e o consequente remodelamento característico.

O modelo experimental de LPA demonstrou:

- ✓ Aumento do infiltrado leucocitário marcado por polimorfonucleares no BAL;
- ✓ Migração de células inflamatórias para os alvéolos pulmonares através a H&E implantada;
- ✓ Aumento de fibras colágenas culminando no remodelamento em casos de modelos experimentais mais longos e severos.

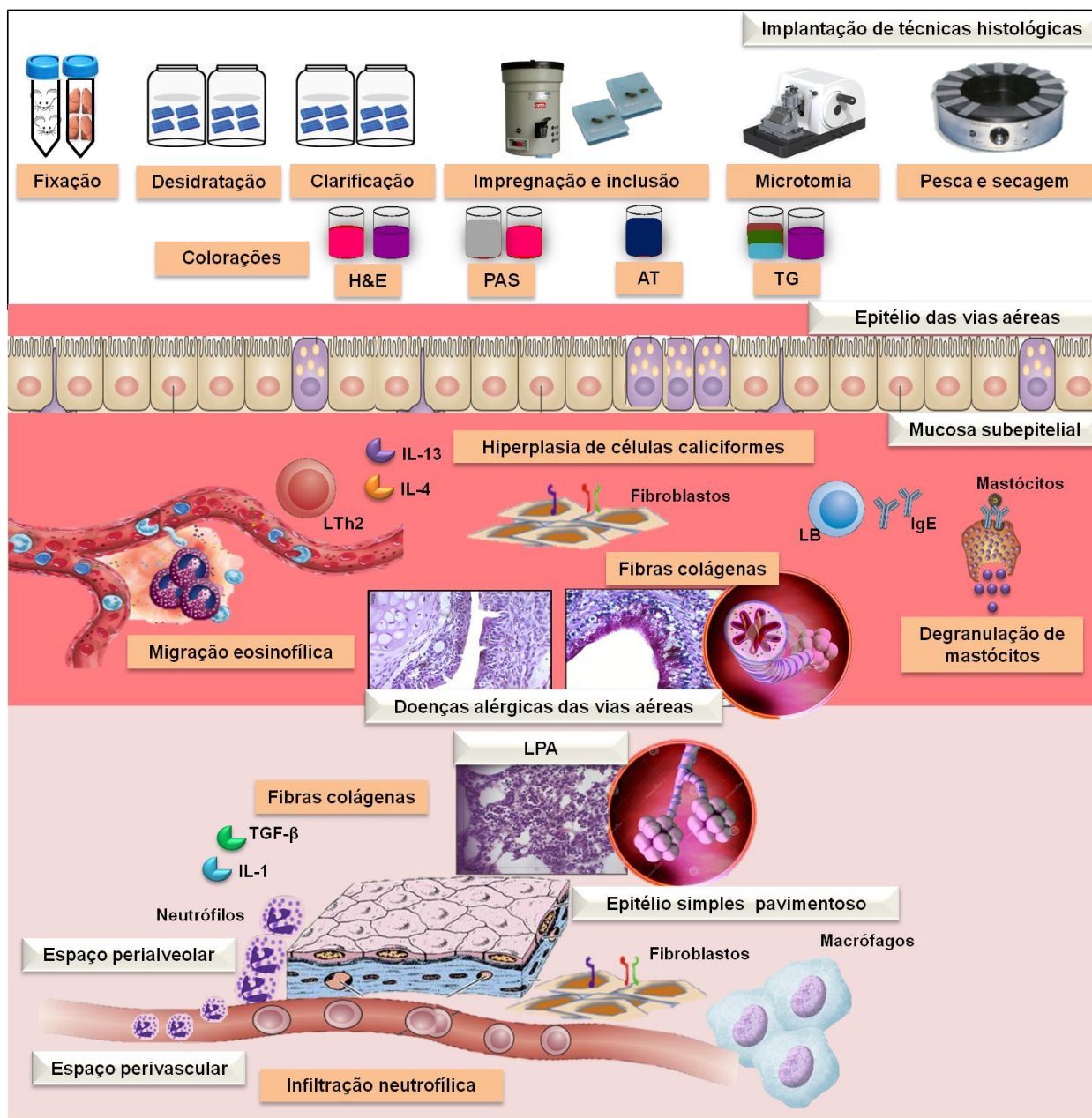


Figura 22. Esquema das etapas do processamento histológico implantado seguido dos parâmetros analisados nos modelos de desordens respiratórias conforme a coloração utilizada. As caixas amarelas sugerem a comprovação dos parâmetros analisados no presente trabalho.

Fonte: Pereira, 2017

REFERÊNCIAS

- ABDELHAY, E. S. F. W.; PARAGUAÇÚ-BRAGA, F. H.; BINATO, R.; BOUZAS, L. F. Hematopoietic stem cells: expansion and perspectives for therapeutic use. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, v. 31, p. 2-8, 2009.
- ALEVY, Y. G.; PATEL, A. C.; ROMERO, A. G.; PATEL, D. A. IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. **Journal Clinical Investigation**, v.122, p. 4555-4568, 2012.
- ANGUS, D. C. The acute respiratory distress syndrome: what's in a name? **JAMA**, v. 307, p.2542-2546, 2012.
- ARDUINI, R. G.; ARAUJO, O. R.; SILVA, D. C.; SENERCHIA, A. A.; PETRILLI, A. S. Sepsis-related acute respiratory distress syndrome in children with cancer: the respiratory dynamics of a devastating condition. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 28, p. 436-443, 2016.
- BAFADHEL, M.; MCKENNA, S.; TERRY, S.; MISTRY, V.; PANCHOLI, M.; VENGE, P.; BRIGHTLING, C. E. Blood Eosinophils to Direct Corticosteroid Treatment of Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Randomized Placebo-Controlled Trial. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, p. 48-55, 2012.
- BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BANDEIRA-MELO, C.; PIUVEZAM, M. R.; BOZZA, P. T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1152-1160, 2006.
- BHATIA, M.; ZEMANS, R. L.; JEYASEELAN, S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.46, p.566-572, 2012.
- BIALECKI, E. S.; EZENEKWE, A. M.; BRUNT, E. M.; COLLINS, B. T.; PONDER, T. B.; BIENEMAN, B. K. Comparison of liver biopsy and noninvasive methods for diagnosis of hepatocellular carcinoma. **Clinical Gastroenterology Hepatology**, v.4, p. 361-368, 2006.
- BISSET, L. R.; SCHMID-GRENDELMEIER, P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 11, p. 35-42, 2005.
- Brasil. Ministério da Saúde. Doenças respiratórias crônicas / Secretaria de Atenção à Saúde. **Cadernos de Atenção Básica**, 25, p.160, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_respiratorias_cronicas.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2017
- BROIDE, D. H.; FINKELMAN, F.; BOCHNER, B. S.; ROTHENBERG, M. E. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 127, p. 689-695, 2011.

BURNAY, E.; CRUZ, C. R.; JACINTO, T.; SOUSA, A. S.; FONSECA, J. Challenges of a mobile application for asthma and allergic rhinitis patient enablement- interface and synchronization. **Telemed.J.e-Health**, v.19, p.13-18, 2013.

CARDOSO, A. C. D.; KIRSZTAJ, G. M. Padrões Histopatológicos das Doenças Glomerulares no Amazonas. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 28, p. 8-12, 2006.

CASTRO, T. M.; PEDROSA, P. G.; MILLAN, R. P. Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico para HPV genital. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 75, p. 167-71, 2009.

CHEN, G.; KORFHAGEN, T. R.; XU, Y.; KITZMILLER, J.; WERT, S. E.; GREGORIEFF, A.; CLEVERS, H. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. **Journal Clinical Investigation**, v.119, p. 2914–2924, 2009.

EVANS, C. M.; RACLAWSKA, D. S.; TTOFALI, F.; LIPTZIN, D. R.; FLETCHER, A. The polymeric mucin MUC5AC is required for allergic airway hyperreactivity. **Nature Communication**, v. 6, p. 6281-6287, 2015.

FARRAJ, A. K.; HARKEMA, J. R.; KAMINSKI, N. E. Topical application versus intranasal instillation: a qualitative comparison of the effect of the route of sensitization on trimellitic anhydride-induced allergic rhinitis in A/J mice. **Toxicology Sciences**, v. 92, p.321-328, 2006.

FUCHS, B.; BRAUN, A. Improved Mouse Models of Allergy and Allergic Asthma. **Current Drug Targets**, v. 9, p. 495-502, 2008.

GIRODET, P. O.; OZIER, A.; BARA, I.; TUNON DE LARA, J. M.; MARTHAN, R.; BERGER, P. Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention. **Pharmacology Therapeutics**, v. 130, p. 325-336, 2011.

GOUR, N.; KARP, W. M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine**, v. 75, p. 68-78, 2015.

GROENEVELD, A. B. J. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 247-56, 2003.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular medicine**, v. 17, p.293-307, 2011.

GUIBAS, G. V.; LAKIS, S.; GKIMPAS, C.; MANDA, M.; KAPOUKRANIDOU, D.; SPANDOU, E. Efficiency of different decalcification protocols for nasal osseous structures in a rat experimental model of allergic rhinitis, and their effects on epithelial histology: An attempt at standardization. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, p. 469-475, 2014.

HOWAT, W. J.; WILSON, B. A. Tissue fixation and the effect of molecular fixates on downstream staining procedures. **Methods**, v. 70, p. 12-19, 2014.

JONES, B. L.; KEARNS, G. L. Histamine: new thoughts about a familiar mediator.

Clinical Pharmacology Therapeutics, v. 89, p.189-97, 2011.

JUNGSUWADEE, P.; DEKAN G.; STINGL G.; EPSTEIN M. M. Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. **Clinical Immunology**, v. 110, p. 13-21, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.

KAP, M.; SMEDTS, F.; OOSTERHUIS, W.; WINTHER, R. N.; CHRISTENSEN, B.; REISCHAUER, C.; VIERTLER, D.; GROELZ, K. F.; BECKER, K.; ZATLOUKAL, R.; LANGER, J.; SLOTTA-HUSPENINA, K.; BODO, B.; DE JONG, U.; OELMULLER, P. Histological Assessment of PAXgene Tissue Fixation and Stabilization Reagents. **Plos one**, v.76, p. 277-281, 2011.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular**. 2ª Ed. uma introdução à patologia. Elsevier, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins patologia básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUPERMAN, D. A.; HUANG, X.; KOTH, L. L.; CHANG, G. H.; DOLGANOV, G M.; ZHU, Z.; ELIAS, J. A.; SHEPPARD, D.; ERLE, D. J. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. **Nature Medicine**, v.8, p. 885-889, 2002.

LEE, I. S.; LEE, S.; PARK, Y. S.; SIK, G. C.; YOOK, J. H.; KIM, B. S. Applicability of endoscopic submucosal dissection for undifferentiated early gastric cancer: Mixed histology of poorly differentiated adenocarcinoma and signet ring cell carcinoma is a worse predictive factor of nodal metastasis. **Surgical Oncology**, v. 26, p. 8-12, 2017.

LEE, Y. Z.; SHAARIB, K.; CHEEMAA, M. S.; THAMA, C. L.; SULAIMANA, M. R.; ISRAFA, D. A. An orally active geranyl acetophenone attenuates airway remodeling in a murine model of chronic asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 797, p. 53-64, 2017.

LEIKAUF, G. D.; MCDOWELL, S. A.; WESSELKAMPER, S. C. Acute Lung Injury: Functional Genomics and Genetic Susceptibility. **Chest Journal**, v, 121, p.70-75, 2002.

LEITE, Fagner C. 1,4 Cineol reduz o recrutamento de neutrófilos via polarização para macrófagos M2 em modelos de inflamação e na lesão pulmonar aguda experimental. 2016. 111 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – IPeFarM, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa.

Li, H. T.; ZHANG, T. T.; CHEN, Z. G.; JIN, Y.; LIU, H.; ZOU, X. L.; WANG, Y. H.; YANG, H. L. Intranasal administration of CpG oligodeoxynucleotides reduces lower airway inflammation in a murine model of combined allergic rhinitis and asthma syndrome. **International Immunopharmacology**, v. 28, p. 390-398, 2015.

Lupetec , Equipamento. Disponível em: <<https://lupetec.com.br/>>. Acesso em 04 de fevereiro de 2017.

MANDHANE, S. N.; SHAH, J. H.; THENNATI, R. Allergic rhinitis: an update on disease, present treatments and future prospects. **International immunopharmacology**, v. 11, p. 1646-1662, 2011.

MANSO, L.; RECHE, M.; PADIAL, M. A.; VALBUENA, T.; PASCUAL, C. Diagnostic tools assessing airway remodelling in asthma. *Allergol. Immunopathology*, v. 40, p. 108-116, 2012.

MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **Journal clinical investigation**, v. 122, p. 2731-2740, 2012.

MATTHAY, M. A.; ZEMANS, R. L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. **Annual Review Pathology**, v. 6, p.147- 163, 2011.

MATTUELLA, L. G. B.; VIER-PELISSER, L. W.; ARAUJO, F. V.; FOSSATI, F. B.; MEDEIROS, A. C. Comparative analysis of two fixating and two decalcifying solutions for processing of human primary teeth with inactive dentin carious lesion. **Revista Odonto Ciência**, v. 22, p.56-62, 2007.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. *American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, v. 3, p 379-399, 2008.

MATZ, M.; COLEMAN, M. P.; SANT, M.; CHIRLAQUE, M. D.; VISSER, O.; GORE, M.; ALLEMANI, C. The histology of ovarian cancer: worldwide distribution and implications for international survival comparisons (CONCORD-2). **Gynecologic Oncology**, v.23, p.1-9, 2016.

MEI, S. H.; MCCARTER, S. D.; DENG, Y.; PARKE, C. H.; LILES, W. C.; STEWART, D. J. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. **PLoS Med**, v. 4, p. 269-774, 2007.

MOLINARO, E. M.; GONÇALVES, L. F.; AMENDOEIRA, M. R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz. 290p. v. 2 - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

MOZZINI, T. M.; COSTA, H. F.; VIEIRA, G. C.; SALGADO, P. R. R.; SALVADOR, M.G.; ALMEIDA, R. N.; VANDERLEI DE SOUZA, M. F.; MATIAS, W. N.; BRAGA, V. A.; NALIVAICO, E.; PIUVEZAM, M. R. Eht showed anti-inflammatory and ansiolitic effects. **Immunity, Inflammation and disease**, v. 10, p. 1-10, 2016.

NAKAYAMA, T.; HIRAHARA, K.; ONODERA, A.; ENDO, Y.; HOSOKAWA, H.; SHINODA, K.; TUMES, D. J.; OKAMOTO, Y. T_H2 Cells in Health and Disease, **Annual Review of Immunology**, v. 35, p.53-84, 2017.

OLIVEIRA, M.T.P. Efeito antiInflamatório do MHTP, uma nova molécula do tipo alcaloide tetrahidroisoquilínico. 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PARK, K. S.; KORFHAGEN, T. R.; BRUNO, M. D.; JOSEPH, A.; WERT, E.; HERSHEY.; KHURANA, G. K.; CHEN, G.; WHITSETT, J. A. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. **Jounal Clinical Investigation**, v.117, p. 978-988, 2007.

PEREIRA, R. F. Avaliação da atividade antialérgica de metilwarifteina, alcaloide da planta *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae), na rinite alérgica experimental. In: XVII Encontro de Iniciação científica, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), 2016, João Pessoa. Paraíba.

PEREIRA, R. F. Implantação de técnicas histológicas e histoquímica no laboratório de imunofarmacologia. In: XVII Encontro de Iniciação científica, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, 2014, João Pessoa. Paraíba.

PONIKAU, J. U.; SHERRIS, A. D.; KEPHART, M. G.; KERN, E. B.; GAFFEY, A. T.; TARARA, J. E.; KITA, H. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: Is the histopathology similar to asthma? **Jounal Allergy Clinnical Immunology**, v.112, p. 887-882, 2003

QUEIROZ, M. R.; FRANCISCO, N. M. J.; GARCIA, R. G.; RAHAL, J. A.; SALVALAGGIO, P.; FUNARI, M.B. High correlation between microbubble contrast-enhanced ultrasound, magnetic resonance and histopathology in the evaluation of hepatocellular carcinoma. **Einstein**, v. 11, p. 500-506, 2013;

RAGHAVENDRAN, K.; PRYHUBER, G. S.; CHESS, P. R. Pharmacotherapy of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. **Current Medicinal Chemistry**, v.15, p. 1911-1924, 2008.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012.

SHAH, D.; BLIEDEN, M.; PARAMORE, L. C.; JOSEPH, B. R. Extracellular ATP mediates the late phase of neutrophil recruitment to the lung in murine models of acute lung injury. **American Journal Physiology Lung cell molecular physiology**, v. 306, p. 152-161, 2014.

SHERWIN, J.; AWAD, I. T.; SADLER, P. J.; LIDDLE, A. M.; ROWBOTHAM, D. J. Analgesia during radial artery cannulation: comparison of the effects of lidocaine applied by local injection or iontophoresis. **Anaesthesia**, v. 58, p. 474-476, 2003.

SHI, S. R.; GU, J.; TURRENS, J.; COTE, R. J.; TAYLOR, C. R. Antigen retrieval techniques: Immunohistochemistry and molecular morphology. **Eaton Publishing**, v.8, p. 287-307, 2000.

SILLIMAN, C. C.; VOELKEL, N. F.; ALLARD, J. D. Plasma and Lipids from Stored Packed Red Blood Cells Cause Acute Lung Injury in an Animal Model. **Journal Clinical Investigation**, v.101, p.1458-1467, 1998.

Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica - SPAIC. **Alergia e Asma duplo Problema**, 2017. Disponível em: < <http://www.spaic.pt/noticias/alergia-e-asma>>. Acesso em: 02 de Abril de 2017.

SPRAGG, R. G.; BERNARD, G. R.; CHECKLEY, W.; CURTIS, J. R.; GAJIC, O.; GUYATT, G.; HARABIN, A. Beyond mortality: future clinical research in acute lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, p.1121-1127, 2010.

TAKAYAMA, G.; ARIMA, K.; KANAJI, T.; TODA, S.; TANAKA, H.; SHOJI, S.; MCKENZIE, A.N.; NAGAI, H.; HOTOKEBUCHI, T.; IZUHARA, T. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 118, p. 98-104, 2006.

TIMM, L. L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v.2, p. 231-239, 2005.

TRONDE, A.; BOSQUILLON, C.; FORBES, B. The isolated perfused lung for drug absorption studies. **Drug Absorption Studies**, v. 7, p. 135-163, 2007.

VIEIRA, G. C. Efeito do tratamento por nebulização com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (menispermaceae) em camundongos BALB / c sensibilizados com ovalbumina. 2008. 149 f. Dissertação (Mestrado Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa.

VIEIRA, G. C.; FEITOSA-DE-LIMA, J.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; MASCARENHAS, S. R.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; PIUVEZAM, M. R. Inhaled *Cissampelos sympodialis* down-regulates airway allergic reaction by reducing lung CD3+T cells. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 1-10, 2013.

WADSWORTH, D. S.; DORSCHIED, D. R. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 4, p.101-112, 2011.

WANG, M.; ZHANG, W.; SHANG, J. Immunomodulatory effects of IL-23 and IL-17 in a mouse model of allergic rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v.34, p.110-116, 2013.

Webnode, Sistema respiratório. Disponível em: <<http://sistema-respiratorio36.webnode.com/>>. Acesso em 02 de Abril de 2017.

Wesapiens, Técnicas histológicas. Disponível em: <<http://www.wesapiens.org/>>. Acesso em 02 de Abril de 2017.

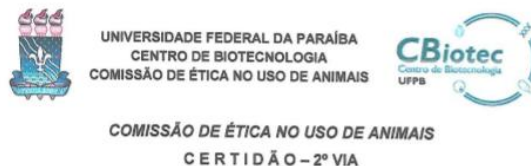
WHEELER, A. P., BERNARD, G. R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **The Lancet**, v. 369, p.1553-1564, 2007.

YOUNG, B.; LOWE, J. S.; STEVENS, A. **Wheater's: Histologia Funcional: Texto e Atlas em Cores**. Editora Elsevier, 2007.

ZHANG, P. L.; JARED R. P.; JEFFERY W. P.; THOMAS M. B.; ADAM M. B.; SANTOSH P. CD52 Antigen May Be a Therapeutic Target for Eosinophilic Rhinosinusitis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 37, p.148-151, 2007.

ANEXOS

Certidão do CEUA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CERTIDÃO – 2ª VIA

João Pessoa, 9 de maio de 2017.
CEUA Nº 1705/13

Ilmo(a). Giciane Carvalho Vieira
Departamento Departamento de Morfologia - CCS - UFPB
Orientando(a): Raquel Fragoso Pereira, (Iniciação Científica)

Ref.: 2ª Via da Certidão CEUA Nº 1705/13.

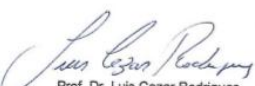
Conforme solicitado por vossa senhoria, estamos emitindo 2ª via da certidão CEUA Nº 1705/13 aprovado em reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de 26/08/2013 que APROVOU a execução do projeto Implantação de Técnicas Histológicas no Laboratório de Imunofarmacologia / UFPB..

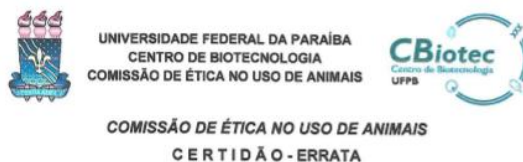
Os demais dados da certidão original seguem inalterados. Caso algum animal já tenha sido utilizado, estes deverão ser descontados do montante relatado na certidão original.

Com previsão original de utilizar 20 Camundongos SWISS Fêmeas - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de 01/08/2013 a 11/09/2014

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CERTIDÃO - ERRATA

João Pessoa, 2 de junho de 2017.
CEUA Nº 1705/13

Ilmo(a). Giciane Carvalho Vieira
Departamento Departamento de Morfologia - CCS - UFPB
Orientando(a): Raquel Fragoso Pereira – (Iniciação Científica)


Ref.: ALTERAÇÃO DA LINHAGEM DOS ANIMAIS NA CERTIDÃO CEUA NÚMERO 1705/13.

Conforme solicitado por vossa senhoria, estamos emitindo errata para a segunda via da certidão CEUA Nº 1705/13 de 09 de MAIO de 2017, aprovado em reunião CEUA de 01/11/2013. Em vista de não haver outra alteração que não seja mudança na linhagem dos animais utilizados no projeto, expressamos abaixo a nova leitura da correspondente certidão.

Onde se lê "20 Camundongos SWISS Fêmeas", leia-se "20 Camundongos BALB/C Fêmeas".

Os demais dados da certidão original seguem tal como estão. Esta errata deve acompanhar a certidão original ou sua segunda via.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Ex-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB